

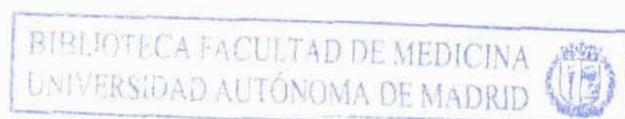
M
Tesis
2544

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MECANISMOS REGULADORES ASOCIADOS A LA
GENERACIÓN DE DIVERSIDAD MUSCULAR EN
Drosophila melanogaster:
REGULACIÓN DEL GEN PARAMIOSINA/MINIPARAMIOSINA Y
EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T**

Reg. F.M. 23.849

TESIS DOCTORAL



Raquel Marco Ferreres

Madrid, Enero 2004

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de SOBRESALIENTE "CUM LAUDE" POR UNANIMIDAD
Madrid, 26 FEBRERO 2004



Rafael Garesse



Ruben Artero



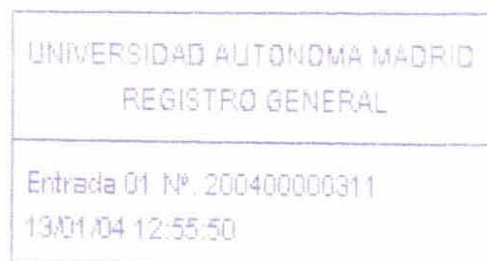
Alberto Ferris



M. Ruy Sured



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**MECANISMOS REGULADORES ASOCIADOS A LA
GENERACIÓN DE DIVERSIDAD MUSCULAR EN
Drosophila melanogaster:
REGULACIÓN DEL GEN PARAMIOSINA/MINIPARAMIOSINA Y
EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T**

Memoria que presenta, para optar al grado
de doctor, la licenciada en Bioquímica

Raquel Marco Ferreres

Directora: **Dra. Margarita Cervera Jover**
Profesora Titular de Bioquímica

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Enero 2004



MARGARITA CERVERA JOVER, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA QUE:

RAQUEL MARCO FERRERES, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Bioquímica, de la Universidad Autónoma de Madrid, el trabajo MECANISMOS REGULADORES ASOCIADOS A LA GENERACIÓN DE DIVERSIDAD MUSCULAR EN *Drosophila melanogaster*: REGULACIÓN DEL GEN PARAMIOSINA/MINIPARAMIOSINA Y EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T.

Considero satisfactorio el trabajo realizado y apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente Certificado en Madrid, a 7 de Enero de 2004

Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión a Raquel Marco Ferreres de una Beca de Formación de Profesorado Universitario parte del Ministerio de Educación y Cultura.

A Jesús

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Hace un par de meses no me podía imaginar que llegaría este momento. Pero sí, al fin llegó y es ahora cuando me doy cuenta de lo difícil que es hacer esta parte sin dejar a nadie olvidado por el camino.

En primer lugar, tengo que darle las gracias a Marga por su apoyo y ayuda en todo momento, especialmente en estos últimos momentos de la tesis. Por las conversaciones, algunas científicas y otras más marujiles, por las risas, pero sobretudo por ser “Mama Marga”. Mil gracias.

A Juan, por enseñarme a “hacerme mayor” en un laboratorio, por los años compartiendo experimentos y momentos inolvidables que hicieron del trabajo algo divertido. Por la amistad.

A Jose, por la ayuda incondicional, por todos estos años de convivencia, por los ánimos cuando éstos estaban por los suelos. Ah! Se me olvidaba, por la figura 23 ☺.

A toda la gente del laboratorio: Jorge, Jose (sí, otra vez), Elena, Vanesa, Blanca Javier, Yolanda y Susana, por su ayuda y por hacer los días más amenos y divertidos.

A Jorge y a Vanesa, por su interés y su trabajo, sin el cual no existirían algunos de los resultados de esta tesis.

A Paco Portillo, por su inestimable ayuda con el one hybrid y dejarnos colonizar su laboratorio a nuestras anchas.

A Benito Fraile por la microscopía electrónica.

A la gente del B-19, Rafa, Belén, Miguel, Paco, Pablo, Cris, Emiliano, Álvaro, Rosana y Pilar, por su simpatía, por sacarme de más de un apuro, por los cotilleos, por los estupendos piscolabis y las entretenidísimas comidas.

A Pilar, por estar siempre dispuesta a ayudar, por su cariño y preocupación.

A Miguel, por recordarme muchas veces lo importante en la vida.

A Roberto, por su simpatía y amabilidad.

Al resto de la gente del pasillo: Rosalía, Susana, Jesús, Belén, Manoli etc... por hacer del Departamento, a pesar de todo, algo agradable, aunque a veces huelan un poco mal.

A Chari, Kiko y Jorge, por su paciencia, y por enseñarme que una de las mejores maneras de aprender es enseñando.

A Pilar y a Gardenia, por esos tres días de respiro y caminata santanderina antes de este esfuerzo final.

A Carmela, por sus consejos pasilliles.

A Héctor, por soportar pacientemente a la pesada de Raquel cada vez que no se entera de los temas de papeleo.

A Carlos, Chema y David, por “los momentos” y por la amistad que surgió de ellos. Ya sé que si no hubiera sido por estos momentos, hubiera sido por otros, pero éstos fueron fantásticos y no se olvidan nunca (ahora sí que parezco la abuela).

A Cris y a la Dra. Peralta, por ayudarme y animarme siempre, por aguantar mis estreses y quejas, por las risas, por las canciones y los bailes, por ser como sois.

A mis padres, por enseñarme las cosas importantes de la vida y a ser como soy, por su cariño y comprensión, por soportarme cuando no hay quien me aguante.

A mi hermana, por lo cariñosa que está desde que no vive en casa.

A mi segunda familia, los Romero Pozuelo, por el cariño, la ayuda incondicional, por ser estupendos, ah!! y por dejarme el ordenador durante estos tres meses 😊.

A Jesús, por quererme tanto, por estar ahí, siempre dispuesto a todo, por apoyarme en todo momento, por alegrarme los días, por todo.

Gracias a todos

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
1. El sistema muscular de <i>Drosophila melanogaster</i>	8
2. El sarcómero como unidad funcional de la fibra muscular	10
3. La Troponina T	14
4. La Paramiosina y la Miniparamiosina	16
5. Control de la expresión de proteínas musculares	18
5.1. Miogénesis de <i>Drosophila</i>	18
5.2. Regulación de los genes musculares estructurales	22
5.3. Regulación del gen de la <i>paramiosina/miniparamiosina</i>	24
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. MATERIALES	31
1.1 Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	31
1.2 Cepas bacterianas	31
1.3 Cepas de levadura	31
1.4 Genoteca de cDNA de <i>Drosophila melanogaster</i> utilizada en el rastreo de “Un Híbrido”	32
1.5 Plásmidos	32
1.5.1 Vectores de clonaje	32
1.5.2 Vectores de expresión	33
1.5.3 Plásmidos utilizados en la construcción de otros plásmidos	33
1.6 Oligonucleótidos	33
1.6.1 Oligonucleótidos utilizados en el estudio del promotor de la Paramiosina	34
1.6.2 Oligonucleótidos utilizados en el estudio del promotor de la Miniparamiosina	34
1.6.3 Oligonucleótidos utilizados en la sobreexpresión de la TnT	35
1.7 Sondas utilizadas en hibridación de RNAs unidos a membrana (<i>Northern-Blot</i>)	36

1.8	Anticuerpos	36
2.	MÉTODOS	37
2.1	Construcciones para el estudio la regulación de la expresión de la PM	37
2.1.1	Mutagénesis de las cajas E	37
2.1.2	Construcciones para el estudio de la función de la región MEF-E	38
2.2	Construcciones para el estudio de la regulación de la expresión de la mPM	39
2.3	Construcción de plásmidos para el estudio de la sobreexpresión de la TnT	40
2.4	Identificación de factores de transcripción que interaccionan con el elemento BF del promotor de la mPM por el método de “Un Híbrido” en levadura	41
2.5	Obtención de ácidos nucleicos	42
2.5.1	Obtención de RNA	42
2.5.2	Obtención de DNAs	42
2.5.2.1	Plásmidos de <i>E.coli</i>	42
2.5.2.2	DNA de <i>D. melanogaster</i>	43
2.5.2.3	DNA de <i>S.cerevisiae</i>	43
2.5.2.4	Fragmentos amplificados por PCR	43
2.6	Análisis por RT-PCR	44
2.7	Hibridación de RNAs unidos a membranas (<i>Northern blot</i>)	44
2.8	Secuenciación y análisis de las secuencias	44
2.9	Obtención de las proteínas	45
2.9.1	Extractos nucleares	45
2.9.2	Expresión de proteínas <i>in vitro</i>	45
2.9.3	Extractos totales	45
2.10	Inmunodetección en membranas. (<i>Western blot</i>)	45
2.11	Ensayo de retardo en gel	46
2.12	Generación de líneas transgénicas	46
2.13	Detección de actividad β -galactosidasa por tinción con X-Gal	47
2.14	Test de vuelo	47
RESULTADOS		48
1.	REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN PM/mPM DE <i>Drosophila melanogaster</i>	49
1.1	Regulación de la transcripción de la Paramiosina	49

1.1.1	Análisis <i>in vivo</i> de la función de las cajas-E de la región MEF-E	49
1.1.2	Análisis <i>in vivo</i> de la funcionalidad de la región MEF-E	54
1.2	Regulación de la transcripción de la Miniparamiosina	61
1.2.1	Análisis <i>in vivo</i> de la función de los módulos conservados AB, BF y TX	61
1.2.2	Búsqueda de factores que interaccionan con la región conservada BF	68
1.2.3	PDP1 activa la expresión de LacZ en los músculos de la cabeza en las larvas de las líneas BF-TX	71
2.	SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T EN LOS MÚSCULOS INDIRECTOS DE VUELO DE <i>Drosophila</i>	75
2.1	Análisis de los niveles de sobreexpresión de la TnT en las líneas OTnT	76
2.2	Niveles de mRNA de componentes del filamento fino	80
2.3	Análisis de la capacidad de vuelo de las líneas OTnT	82
2.4	Estructura de los IFM de las líneas OTnT	85
	DISCUSIÓN	87
1.	REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN PM/mPM DE <i>Drosophila melanogaster</i>	88
1.1	Papel de las cajas E de la región MEF-E del gen PM/mPM	90
1.2	Organización modular del promotor que controla la expresión de la PM	92
1.3	Organización modular del promotor que controla la expresión de la mPM	96
1.4	PDP1 participa en la regulación de la transcripción de la mPM	98
2.	EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T EN LOS MÚSCULOS INDIRECTOS DE VUELO	100
2.1	El aumento de los niveles de TnT provoca una disminución de la acumulación de esta proteína	100
2.2	El aumento de TnT en los IFM conlleva una reducción de la síntesis de las proteínas del filamento fino	102
	CONCLUSIONES	104
	BIBLIOGRAFÍA	107
	ANEXO	126

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La diferenciación de los distintos músculos de un organismo requiere de la ejecución coordinada de programas reguladores que van a determinar la expresión diferencial de genes y la producción de isoformas específicas. Uno de los mecanismos mejor conocidos implicado en la generación de diversidad muscular es la regulación de la transcripción.

El gen *paramiosina/miniparamiosina* de *Drosophila* codifica dos proteínas del filamento grueso de invertebrados: la Paramiosina (PM) y la Miniparamiosina (mPM) que se transcriben a partir de dos promotores distintos. La expresión de la PM está regulada por un activador muscular distal de 900 pb, localizado a 1.4 kb del inicio de la transcripción, que es esencial para activar la expresión en todos los músculos de *Drosophila*, excepto en los músculos indirectos de vuelo. Esta región contiene tres sitios de unión para el factor MEF2 conservados. Sin embargo, para la correcta expresión de la proteína se requiere también la presencia de otros elementos localizados en posición 3' de este activador (región moduladora proximal) que contribuyen a modular los niveles de expresión. Por otro lado, la expresión de la mPM, está regulada por dos activadores: AB y TX, y un modulador: BF. AB es responsable de la expresión en los músculos indirectos de vuelo mientras que TX la activa en el resto de la musculatura. BF es responsable de modular los niveles de expresión de la mPM en los músculos torácicos de la mosca. Este elemento une el factor de transcripción PDP1, que parece ser esencial en la expresión de la mPM.

Las proteínas musculares se acumulan en cantidades diferentes en los distintos músculos pero manteniendo siempre una estequiometría muy precisa. En este trabajo demostramos que el aumento de los niveles de expresión en los músculos indirectos de vuelo de *Drosophila* de un componente del filamento fino: la Troponina T, produce una disminución de su síntesis y de la del resto de componentes del filamento fino. Este fenómeno interfiere con la formación de los sarcómeros provocando graves alteraciones en la estructura y función de estos músculos. Estos resultados sugieren que la Troponina T es un componente clave en un mecanismo de regulación *feedback* que controla la expresión de las proteínas del filamento fino.

SUMMARY

The correct patterning and differentiation of muscles require the coordinated execution of regulatory programs which determine the differential gene expression and the production of specific protein isoforms. One of the mechanisms best understood which is, indeed, implicated in muscle diversity generation is the transcriptional regulation.

The *Drosophila paramyosin/miniparamyosin* gene encodes two thick filament proteins of invertebrate muscles: the Paramyosin (PM) and the Miniparamyosin (mPM) which are transcribed from two different promoters. The PM expression is regulated by a distal muscle enhancer located at 1.4 kb from the transcription start site. This enhancer is essential to drive high expression in all *Drosophila* muscles, except in indirect flight muscles. This region contains three conserved MEF2 binding sites. However, the correct expression requires the presence of other elements located downstream of this enhancer which modulate the expression levels. On the other hand, the mPM expression is regulated by two enhancers: AB and TX, and one modulator: BF. AB is responsible of high levels of expression in indirect flight muscles whereas TX activates transcription in the rest of adult muscles. BF modulates the expression levels in the fly thoracic muscles. This element binds the transcription factor PDP1 which seems to be essential for proper mPM expression.

The distinct muscles of an organism accumulate different quantities of structural proteins, but always maintaining an accurate stoichiometry. In this work, we demonstrate that an increase of a thin filament component, the Troponin T, in the *Drosophila* indirect flight muscles, causes a decrease of its own synthesis and that of the rest of thin filament proteins. This effect interferes with sarcomere formation causing profound alterations in the muscle structure and function. These results suggest that Troponin T is a key component in a feedback regulatory mechanism that controls the expression of thin filament proteins.

ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
APF	Después de la formación del pupario (<i>After Pupa-rium Formation</i>)
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
β -gal	β -galactosidasa
DEPC	Dietil pirocarbonato
DFM	Músculos directos de vuelo
DLM	Músculos dorso-longitudinales
DVM	Músculos dorso-ventrales
IFM	Músculo indirecto de vuelo
MHC	Cadena pesada de la miosina
MLC	Cadena ligera de la miosina
mPM	Miniparamiosina
PM	Paramiosina
RT	Retrotranscripción
TBS	Tampón Tris salino
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TDT	Músculo depresor tergal del trocánter
Tm	Tropomiosina
TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TnIf	TnI específica de las fibras musculares de contracción rápida
TnIs	TnI específica de las fibras musculares de contracción lenta
TnT	Troponina T
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
yw	<i>yellow white</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El músculo es un tejido especializado en la contracción, un proceso en el que se produce la transformación de energía química por hidrólisis de ATP en energía mecánica, en forma de movimiento. El sistema contráctil consta de filamentos proteicos ordenados con capacidad para deslizarse unos sobre otros al recibir un estímulo nervioso. En la naturaleza existe una gran diversidad de estructuras musculares surgidas como consecuencia de la especialización de cada tejido.

El empleo de la biología y la genética molecular ha permitido la caracterización de muchos de los genes que codifican proteínas musculares (Bernstein *et al.*, 1993; Schiaffino & Reggiani, 1996). *Drosophila melanogaster* ha sido uno de los organismos más utilizados como sistema modelo en el análisis del sistema muscular no sólo por sus ventajas genéticas, sino también por motivos estructurales (Bernstein *et al.*, 1993). Este insecto posee músculos prescindibles para su viabilidad, entre los que se encuentran los músculos indirectos de vuelo o IFM. Estos músculos están muy organizados y por ello son muy sensibles a las alteraciones causadas por mutaciones en proteínas musculares. Las mutaciones que se expresan en ellos presentan un fenotipo de fácil reconocimiento como es la incapacidad para volar. Otra ventaja importante que añadir es que, en *Drosophila*, en la mayor parte de los casos, las diferentes isoformas de cada proteína muscular están codificadas por un mismo gen, mientras que en vertebrados las proteínas musculares están codificadas por familias multigénicas que, a veces, llegan a estar formadas por más de treinta genes, como es el caso de la miosina (Emerson & Bernstein, 1987). Cada uno de los miembros de estas familias se transcribe con especificidad de tipo muscular y temporal. Esto hace de este organismo un sistema particularmente útil para el estudio de la regulación de la transcripción tanto temporal como específica de tejido. A todas estas ventajas hay que añadir la sencillez que presenta la producción de animales transgénicos, mediante el empleo de transposones (generalmente elementos P) en la línea germinal (Spradling & Rubin, 1982).

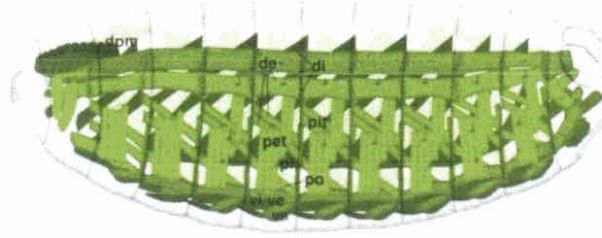
1. El sistema muscular de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster, como insecto holometábolo, posee un ciclo vital dividido en dos fases. Tras el desarrollo embrionario, hay una primera fase de larva que posteriormente sufre un proceso de metamorfosis en el que se genera el individuo adulto. En *Drosophila* el desarrollo embrionario dura a 25°C unas 24 horas (Campos-Ortega & Hartenstein, 1985). Tras este período, emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios. A los cinco días del inicio del desarrollo, comienza la pupación de la larva. En este momento se histolizan la mayoría de los tejidos y la morfología del adulto se genera a partir de los discos imaginales. El adulto emerge del pupario aproximadamente al décimo día del desarrollo.

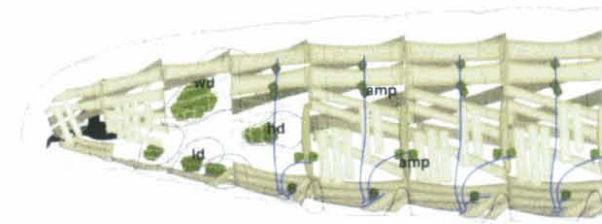
A lo largo del desarrollo de *Drosophila* se producen dos tipos de sistemas musculares, los músculos larvarios y los músculos del adulto. A diferencia de lo que ocurre en vertebrados, los músculos de la mosca son siempre de apariencia estriada y están formados por una sola fibra muscular multinucleada.

En la larva, hay tres tipos fundamentales de músculo, los músculos hipodérmicos, los músculos viscerales y el músculo cardíaco. Los músculos hipodérmicos tienen dos funciones, por una parte se encargan de mantener la forma de la larva es decir, son músculos esqueléticos (Bate, 1990; Bate & Martínez Arias, 1993) y por otra de proporcionarle movimiento mediante el acortamiento y alargamiento del cuerpo. Cada segmento abdominal se compone de 30 pares de músculos hipodérmicos (Figura 1). Todos estos músculos son fisiológicamente idénticos, aunque cada uno de ellos es único en términos de tamaño, forma, puntos de anclaje e inervación. Los músculos viscerales recubren el tubo digestivo formando dos capas, una longitudinal y otra transversal. El músculo cardíaco forma el conducto dorsal en *Drosophila*, que es la estructura equivalente al corazón de vertebrados. Todos estos músculos son supercontráctiles debido a que tienen una gran capacidad para contraerse pudiendo pasar los microfilamentos a través del disco Z del otro extremo del sarcómero.

Embrión



Larva



Musculatura larvaria
 Nervios periféricos larvarios
 Presunta musculatura adulta

Adulto

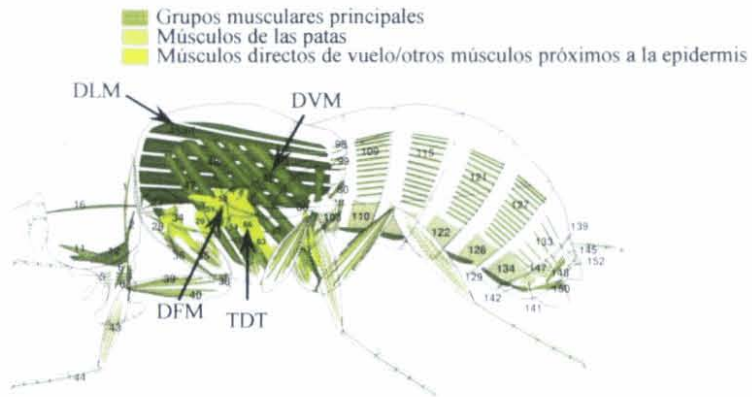


Figura 1. Representación esquemática de la musculatura somática en distintos estadios del desarrollo de *Drosophila melanogaster*. El embrión y la larva de *Drosophila* (panel superior e intermedio) muestran una distribución segmental de sus músculos somáticos. Cada segmento abdominal se compone de 30 pares de músculos hipodérmicos. Los músculos de cada segmento son idénticos fisiológicamente. Sin embargo, los músculos somáticos del adulto (panel inferior) son diferentes morfológica y fisiológicamente. La musculatura del abdomen presenta una distribución segmental mientras que en el tórax existe una distribución no segmental y una especialización funcional. En el esquema se destacan los músculos más representativos del tórax. DLM: músculos dorso-longitudinales; DVM: músculos dorso-ventrales; DFM: músculos directos de vuelo; TDT: músculo depresor tergal del trocánter. Esquema tomado de Bate y Martinez Arias, 1993.

La formación de los músculos adultos se produce durante la metamorfosis. La metamorfosis comienza unas 100 horas después de la fecundación y parece estar inducida por la liberación de la hormona ecdisona. La mayor parte de los músculos hipodérmicos larvarios son histolizados. Sin embargo, algunos de los músculos larvarios persisten y van a ser los precursores de algunos músculos del adulto (Bate & Martinez Arias, 1993). No obstante, la mayoría de éstos se va a formar *de novo* durante la metamorfosis.

En el adulto, aparecen una serie de músculos que están especializados en el vuelo y funciones relacionadas. La mayor parte del volumen torácico está ocupado por los músculos indirectos de vuelo (IFM) y los depresores tergaes del trocánter (TDT). Los IFM se dividen en músculos dorso-longitudinales (DLM) y dorso-ventrales (DVM) (Figura 1). Son los encargados de producir el batido de las alas al actuar sobre el exoesqueleto del insecto. Los IFM son fibrilares, teniendo morfológicamente la estructura más ordenada de todos los músculos de la mosca. Cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos finos formando una red hexagonal, típica de este tipo de músculo (Figura 2B). Estos músculos son asincrónicos debido a que se contraen con mayor frecuencia que la llegada de estímulos nerviosos al músculo. El exceso de contracciones respecto a la llegada de estímulos nerviosos en el IFM se debe a que se produce un fenómeno llamado activación por estiramiento, en el que la deformación del exoesqueleto en el batir de las alas induce nuevas contracciones del músculo sin que lleguen otros estímulos nerviosos (Bernstein *et al.*, 1993). Los TDT son un par de músculos que actúan sobre el segundo par de patas induciendo el salto de la mosca como paso inicial para comenzar el vuelo. Estos músculos son tubulares y se contraen sincrónicamente, es decir, una vez por cada estímulo nervioso. Además de estos tipos de músculo, en el adulto encontramos otros músculos también tubulares, como son los músculos directos de vuelo (DFM), los de las patas, los hipodérmicos.

2. El sarcómero como unidad funcional de la fibra muscular

Los estudios estructurales clásicos se han realizado generalmente sobre músculo estriado esquelético de vertebrados y sobre músculo indirecto de vuelo de insectos (IFM), ya que son los que presentan una organización más regular (Figura 2).

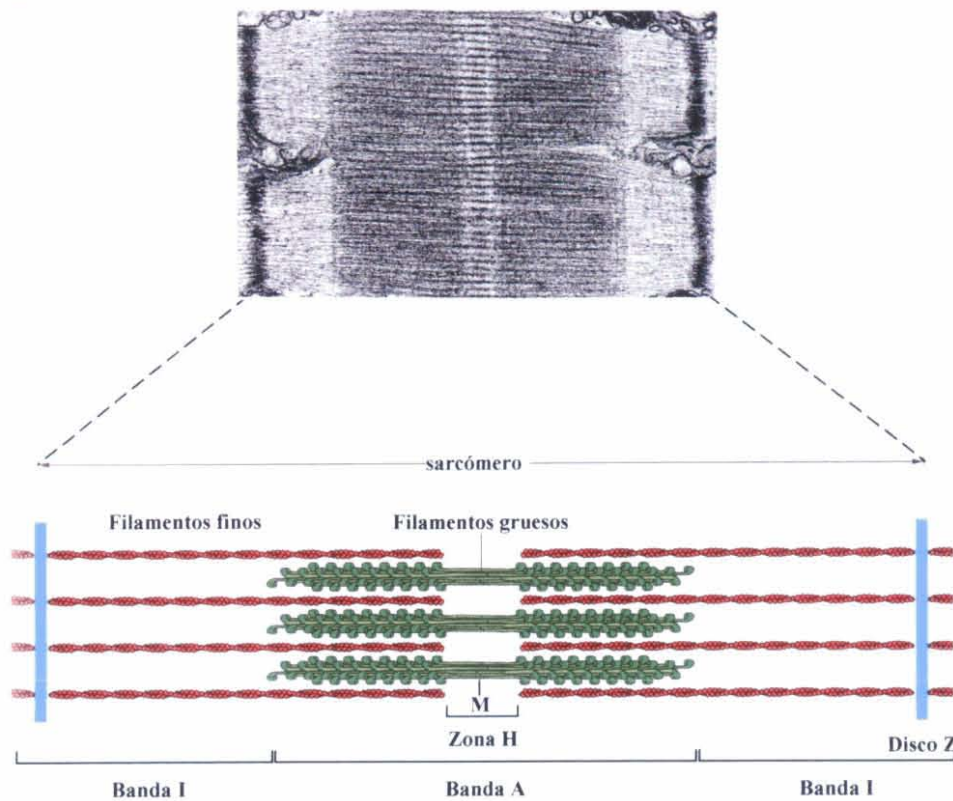
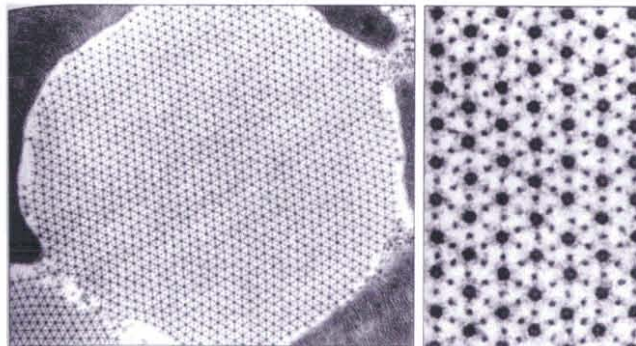
A**B**

Figura 2. El sarcómero. **A.** Micrografía electrónica de una sección longitudinal de un sarcómero de músculo estriado de ratón. Reproducido a partir de la micrografía original de Dadoune S.P. en “Biología Molecular y Celular” Darnell J. Lodish, H. y Baltimore, D. (1988). En la parte inferior se esquematiza la estructura del sarcómero donde se destacan las distintas zonas y la posición relativa de los filamentos gruesos y finos. Esquema modificado de Alberts et al. en Biología Molecular de la Célula (1994). **B.** Micrografía electrónica de una sección trasversal del músculo indirecto de vuelo de *Drosophila*. Cada filamento grueso está rodeado de seis filamentos finos formando una red hexagonal perfecta. Imagen tomada de Alberts et al. en Biología Molecular de la Célula (1994).

La estructura general de los sarcómeros es la misma, aunque existen diferencias morfológicas y de composición entre ellos, ya que algunas proteínas identificadas en vertebrados no lo han sido en invertebrados y viceversa (Bennett *et al.*, 1986; Einheber & Fischman, 1990; Vigoreaux *et al.*, 1993; Vinós *et al.*, 1992). Los estudios se han extendido al músculo cardíaco de vertebrados, de apariencia morfológica muy parecida al estriado esquelético, y especializado en el movimiento periódico y continuo de contracción cardíaca.

El músculo estriado está formado por fibras musculares, cada una de las cuales es una única célula polinucleada integrada por un conjunto de miofibrillas que se disponen de forma paralela y están rodeadas de retículo sarcoplásmico, un sistema de membranas implicado en el acoplamiento excitación-contracción (Flucher, 1992). Cada miofibrilla está formada por una cadena de minúsculas unidades contráctiles o sarcómeros que confieren a la miofibrilla su apariencia estriada. A gran aumento, en cada sarcómero pueden verse una serie de bandas claras (bandas I) y oscuras (bandas A). Cada unidad está separada de la siguiente por una línea electrodensa, situada en el centro de cada banda clara, denominada línea Z o disco Z (Figura 2A). Cada sarcómero está formado por dos grupos de microfilamentos paralelos entre sí y parcialmente superpuestos, los filamentos gruesos (15-30 nm de diámetro) y los filamentos finos (8-10 nm de diámetro). Los filamentos gruesos se extienden desde un extremo a otro de la banda A, mientras que los delgados parten de los discos Z, se extienden a través de la bandas I y penetran parcialmente en la banda A. La zona de la banda A en la que sólo hay filamentos gruesos se denomina zona H, en su centro se localiza la línea M, una región situada equidistante de los dos discos Z que delimitan el sarcómero (Figura 2A).

El filamento fino está formado principalmente por Actina, una proteína globular de 42 kDa cuyo ensamblaje genera un filamento al que se unen otras proteínas. Para formar el filamento fino, los monómeros de Actina polimerizan formando una doble hélice dextrógira, siempre con polaridad definida (Squire & Morris, 1998). Al filamento de Actina se une la Tropomiosina (Tm), una proteína dimérica con estructura *coiled-coil*. Estos dímeros forman polímeros, ocupando los dos surcos del filamento de Actina (Basi & Storti,

1986). Cada molécula de Tm a su vez, interacciona con el complejo Troponina (Tn), formado por tres polipéptidos, TnT, TnI y TnC. La TnT en *Drosophila* tiene dominios de interacción con la Tm, con la TnC y la TnI y está involucrada en el correcto posicionamiento del complejo Troponina sobre la Tm (Squire & Morris, 1998)(Figura 3). La TnI inhibe, por unión a la Actina, la interacción de ésta con la Miosina en estado de reposo. La TnC es el sensor de calcio en el aparato contráctil (Fyrberg *et al.*, 1994). Posee dominios de unión a Ca^{2+} y al captar estos iones ejerce una acción directa sobre la TnI que provoca un cambio en el posicionamiento del complejo Tm-Tn sobre el filamento de Actina, permitiendo su interacción con el filamento grueso.

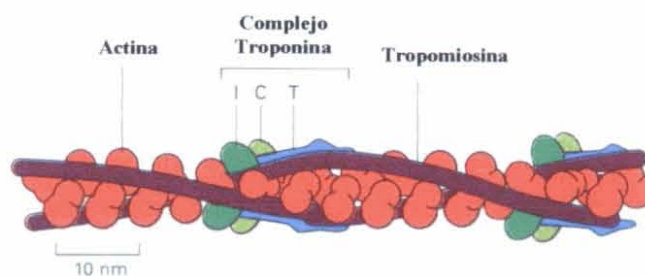


Figura 3. Localización de la Tropomiosina y el complejo Troponina sobre el filamento de Actina. Cada 7 monómeros de Actina se localiza una molécula de Tropomiosina (Tm) y un complejo Troponina. El complejo Troponina está formado por las Troponinas T, C e I. La TnT interacciona con la Tm posicionando al resto del complejo sobre el filamento fino. La TnI en estado de reposo impide la interacción del filamento de Actina con las cabezas de Miosina. Al aumentar la concentración de Ca^{2+} en la célula, la interacción de estos iones con la TnC produce un cambio conformacional haciendo que la TnI se separe de la Actina. Esto hace que se desplace la Tm quedando expuestos en el filamento de Actina los sitios de unión a la Miosina. Esquema obtenido de Alberts *et al.* en *Biología Molecular de la Célula* (1994).

El filamento grueso está compuesto principalmente de Miosina, una proteína hexamérica compuesta a su vez por tres tipos de cadenas polipeptídicas, la cadena pesada de la miosina (MHC), y dos tipos de cadena ligera (MLCs). Los dominios hélice- α de las cadenas pesadas se enrollan formando una estructura *coiled-coil* (Cohen & Holmes, 1963), mientras que las cabezas globulares interaccionan con las cadenas ligeras. En invertebrados, los otros dos componentes mayoritarios del filamento grueso, son la Paramiosina (PM) y la Miniparamiosina (mPM) (Maroto *et al.*, 1995; Maroto *et al.*, 1996).

En ocasiones, la primera de ellas puede ser incluso más abundante que la propia Miosina (Bernstein *et al.*, 1993; Vinós *et al.*, 1991). La Paramiosina es un dímero cuyas hélices α también forman una estructura *coiled-coil* que interacciona con la estructura equivalente de la Miosina (Bennett & Elliott, 1984; Harris & Epstein, 1977; Hoppe & Waterston, 1996). La interacción genera un patrón alternante de cargas positivas y negativas asociado a una unidad de repetición de 28 aminoácidos presente en la Miosina y la Paramiosina. La interacción solapada entre dominios de cargas opuestas juega un papel muy importante en la formación del filamento grueso (Kagawa *et al.*, 1989; McLachlan & Karn, 1982). En cambio, los dominios C-terminal de ambas proteínas parece que realizan un papel modulador en el ensamblaje del filamento (Cohen & Parry, 1998). A pesar de todo lo dicho, la organización y localización exacta de la Paramiosina en la estructura del filamento grueso de los diferentes tipos musculares en invertebrados no está del todo clara. Se ha propuesto que la Paramiosina se ensambla en el núcleo del filamento. Esta disposición facilitaría la unión de la Miosina que es el motor funcional del filamento grueso en la periferia del filamento. Los filamentos gruesos de invertebrados varían en longitud, grosor, rigidez y densidad electrónica en función de la cantidad de Miosina y Paramiosina y también de proteínas minoritarias, entre las que se encuentran la Miniparamiosina, la Flightina o la “Myosin Rod Domain” (Barral & Epstein, 1999; Becker *et al.*, 1992; Maroto *et al.*, 1996; Standiford *et al.*, 1997; Vigoreaux *et al.*, 1993; Vinós *et al.*, 1992).

3. La Troponina T

La Troponina T es una proteína contráctil que forma parte del filamento fino del sarcómero. Está formando un complejo junto con las Troponinas I y C y la Tropomiosina. La Troponina T (TnT), recibe este nombre por tener afinidad por la Tropomiosina (Tm) aunque como se ha mencionado anteriormente también interacciona con las Troponinas I y C (Figura 3). Es un polipéptido que tiene un tamaño de 36-39 kDa en vertebrados (Schiaffino & Reggiani, 1996) y 47-53 kD en *Drosophila melanogaster* (Fyrberg *et al.*, 1992). Esta variabilidad en el tamaño es debida a dos factores fundamentalmente, el procesamiento alternativo de exones, que da lugar a la existencia de isoformas con distinto

tamaño dentro de la misma especie, y a las diferencias de longitud en el extremo carboxilo-terminal que existen entre las TnTs de distintos grupos filogenéticos (Benoist *et al.*, 1998).

En vertebrados, la TnT está codificada por tres genes distintos, dos específicos de músculo esquelético (uno de fibras rápidas y otro de fibras lentas) y otro específico del músculo cardíaco (Schiaffino & Reggiani, 1996). Estos genes y los de la TnI están agrupados en el genoma de ratón y el de humanos por parejas sugiriendo una coevolución de los genes de la TnT y TnI (Barton *et al.*, 2000; Huang & Jin, 1999). Además, presenta un complejísimo patrón de isoformas que resulta tanto del procesamiento alternativo de exones como de modificaciones postraduccionales. En *Drosophila* está codificada por un único gen (Fyrberg *et al.*, 1990) que está localizado en la banda 12A del cromosoma X. El gen está organizado en 12 exones, presenta un primer exón no traducido, un microexón de 3 pares de bases, 5 exones alternativos (3,4, 5, 10A y 10B) y dos sitios de poliadenilación (Benoist *et al.*, 1998); (Herranz and Marco, datos no publicados). La variabilidad generada por procesamiento alternativo en la región amino-terminal le da especificidad de tipo muscular y la del carboxilo-terminal aparece asociada a grupo filogenético (Benoist *et al.*, 1998). El procesamiento alternativo del pre-mRNA genera cinco transcritos diferentes. Estos transcritos se expresan en distintos tipos de músculo y en distintas etapas del desarrollo de la mosca (Benoist *et al.*, 1998) (Herranz and Marco, datos no publicados).

Clásicamente a la TnT se le ha asignado la función de unir el complejo Troponina a la Tm y por tanto al filamento fino (Ohtsuki & Nagano, 1982). En vertebrados, la mitad N-terminal de la TnT interacciona con el extremo C-terminal de la Tm, mientras que la región de interacción con las Troponinas I y C mapea en el extremo C-terminal de la TnT (Perry, 1998). Posteriormente, algunos estudios mostraron que la TnT estaba implicada junto con la TnC en proporcionar al filamento fino sensibilidad al calcio (Potter *et al.*, 1995). Se ha delimitado incluso dentro de la secuencia de la TnT la región implicada en esta función y se encuentra en la región de interacción con la TnC. Asimismo, estudios hechos en la TnT de pollo han revelado que en la región amino-terminal, precisamente donde se produce la variabilidad por procesamiento alternativo, hay un dominio de unión a cationes divalentes y que la unión de éstos a ese dominio produce cambios conformacionales a lo largo de la molécula (Ogut & Jin, 1996; Wang & Jin, 1998). La TnT

de *Drosophila* también se ha descrito que une Ca^{2+} (Domingo *et al.*, 1998). Aparte de estas funciones, recientemente se ha demostrado que el extremo N-terminal de la TnT de vertebrados, al igual que la TnI, en estado de reposo, inhibe la interacción de la Miosina del filamento grueso con la Actina (Maytum *et al.*, 2002; Tobacman *et al.*, 2002). Todos estos trabajos indican que la TnT no sólo cumple un papel estructural sino que también constituye un importante regulador de la contracción muscular.

Un gran número de casos de cardiomiopatía hipertrófica familiar, la principal causa de muerte súbita en atletas jóvenes, se deben a mutaciones en la TnT cardíaca (Watkins *et al.*, 1995). Las proteínas mutantes parecen actuar de forma dominante-negativa afectando a la función del músculo cardíaco (Seidman & Seidman, 2001). Una gran parte de estas mutaciones mapean en la región de interacción con la Tm (Bonne *et al.*, 1998). Se ha descrito que la interacción de la TnT con la Tm produce un aumento de la afinidad de la Tm por la Actina, favoreciendo así el ensamblaje y estabilización del filamento fino (Hinkle *et al.*, 1999; Palm *et al.*, 2001). Esta región, como se ha mencionado antes, también es responsable de favorecer un estado conformacional que bloquea la unión del filamento grueso con la Actina.

En *Drosophila*, los mutantes de la TnT, *upheld*² y *upheld*³, en los que esta proteína no se produce o lo hace en pequeñas cantidades, muestran una profunda alteración de los músculos indirectos de vuelo (IFM) (Fyrberg *et al.*, 1990). Estos mutantes presentan ausencia de filamentos finos o alteración en la cantidad de los mismos. Un fenotipo similar lo presentan los mutantes *silent heart* de pez cebra, en los que hay una gran disminución o ausencia de TnT cardíaca (Sehnert *et al.*, 2002). Estos datos indican que la TnT es esencial para la formación y estabilización del filamento fino.

4. La Paramiosina y la Miniparamiosina

La Paramiosina y la Miniparamiosina son dos proteínas del filamento grueso del músculo estriado de invertebrados. Ambas proteínas se han encontrado en todas las especies de invertebrados estudiadas menos en *C. elegans* (Maroto *et al.*, 1995).

La Paramiosina (PM) de *Drosophila* es un componente principal del filamento grueso junto con la Miosina y su estructura es similar a la de otros invertebrados. Es un

dímero con una estructura central *coiled-coil* formada por el enrollamiento de dos hélices- α y dos regiones terminales muy cortas no helicoidales (Vinós *et al.*, 1991; Vinós *et al.*, 1992). Su estructura es similar a la cola de la cadena pesada de la Miosina. Cada monómero tiene un peso molecular de 107 kDa. En *Drosophila melanogaster* existen tres isoformas con un tamaño parecido (Vinós *et al.*, 1992). La isoforma más ácida, fosforilada, parece estar relacionada con la puesta en funcionamiento de la musculatura de vuelo (Maroto *et al.*, 1996). Además, como en el caso de las cadenas ligeras de la Miosina y la Flightina, la fosforilación de las isoformas de la PM parece modular el ensamblaje y funcionamiento de los filamentos gruesos (Sparrow, 1995; Tohtong *et al.*, 1995; Vigoreaux & Perry, 1994).

La PM se expresa durante el desarrollo siguiendo el mismo patrón que otras proteínas contractiles, pudiéndose detectar a partir de las 9-10 horas de desarrollo embrionario y permaneciendo hasta el tercer estadio larvario. Luego se detecta de nuevo en pupas intermedias y se mantiene en adultos. Curiosamente, existe PM en el oocito maduro, aunque el nivel de mensajero es apenas detectable (Vinós *et al.*, 1991; Vinós *et al.*, 1992). Recientemente, el grupo de S. Bernstein ha descrito el fenotipo de un mutante, *prm1*, que presenta una ausencia casi total de PM (el contenido en PM es de menos del 1% comparado con la cepa salvaje). Estos mutantes mueren en la etapa de embrión tardío y tienen defectos muy importantes en la fusión de los mioblastos y en el ensamblaje de las miofibrillas en los músculos hipodérmicos del embrión (Liu *et al.*, 2003). La PM se encuentra en todos los músculos de *Drosophila*, tanto en la larva como en la mosca adulta, aunque no siempre en la misma cantidad (Vinós *et al.*, 1991).

La Miniparamiosina (mPM) es un componente minoritario del filamento grueso. Ésta, es una proteína específica de invertebrados que se ha encontrado en diferentes órdenes filogenéticos (Maroto *et al.*, 1995). Los 363 aminoácidos correspondientes a la zona C-terminal son iguales a los del mismo extremo de la PM y conserva, por tanto, todas sus características estructurales. Los 113 aminoácidos de la zona N-terminal no son homólogos a ninguna región de la secuencia de la PM ni a ningún otro péptido descrito. También es una proteína dimerica, donde cada monómero tiene un peso molecular de aproximadamente 55 kDa.

Su expresión se comienza a detectar en larvas del tercer estadio, disminuye fuertemente en pupas tempranas y se detecta de nuevo en pupas tardías e imagos. La mPM se expresa en todos los músculos de la mosca, aunque los niveles y su distribución en el sarcómero difieren de unos músculos a otros (Maroto *et al.*, 1996). Es especialmente abundante en el músculo tubular TDT, donde se distribuye a lo largo de toda la banda A del sarcómero, mientras que es minoritaria en los músculos indirectos de vuelo (IFM) localizándose principalmente en la línea M y en los extremos de la banda A. Un aumento de los niveles de mPM en IFM produce, con el funcionamiento de los mismos, una degeneración progresiva de las miofibrillas provocando la pérdida de función de estos músculos (Arredondo *et al.*, 2001b). Esto indica que la correcta estequiometría de la mPM en IFM es esencial para la integridad y el buen funcionamiento de los mismos. Se han identificado seis isoformas fosforiladas de la mPM en los músculos de la cabeza y torácicos. Como en el caso de la PM, es posible que la fosforilación/defosforilación de la mPM esté involucrada en la adquisición de la capacidad de vuelo (Maroto *et al.*, 1996).

5. Control de la expresión de proteínas musculares

5.1 Miogénesis de *Drosophila*

Desde un punto de vista molecular, en los últimos años, se han producido grandes avances en el conocimiento de los mecanismos de determinación de los músculos embrionarios de *Drosophila*. La musculatura embrionaria deriva del mesodermo. Esta capa se forma en la parte más ventral del embrión cuando éste se encuentra aún en fase de blastodermo. Esta región es determinada por el gen de origen materno *dorsal* (Bate & Martinez Arias, 1993). Durante la gastrulación del embrión, se produce una invaginación y las células localizadas en la zona ventral migran dorsalmente (Leptin & Grunewald, 1990). Las células de la capa interna del mesodermo son homogéneas, desde el punto de vista de los marcadores que expresan. Todas las células mesodérmicas expresan el gen *twist* (*twi*) (Thisse *et al.*, 1988), así como sus dianas, los genes *tinman* (*tin*) (Bodmer, 1993; Yin *et al.*, 1997) y *Dmef2* (Cripps *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 1994). Las células invaginadas se dividen en distintos dominios a partir de los cuales se diferenciarán los distintos tejidos

mesodérmicos (Riechmann *et al.*, 1997). En este proceso de división funcional intervienen distintos genes. En la división dorsoventral interviene el gen de la familia del TGF- β , *decapentaplegic* (*Dpp*) (Frasch, 1995), sin embargo, en la división antero posterior intervienen dos genes de segmentación como son, *even-skipped* y *sloppy paired* (Azpiazu *et al.*, 1996; Riechmann *et al.*, 1997). El mesodermo queda así dividido en una serie de regiones que a su vez se subdividen en cuatro dominios. Cada uno de estos cuatro dominios da origen a una población de progenitores de diferentes tejidos mesodérmicos (Figura 4). A partir de la región dorsal de estos dominios mesodérmicos se producirán los músculos viscerales (zona anterior) y el corazón (zona posterior), y a partir de la región ventral los cuerpos grasos (zona anterior) y la musculatura somática (zona posterior) (Baylies *et al.*, 1998). En esta última región se mantiene una alta expresión del gen *twist* (Baylies & Bate, 1996). La diferenciación de la musculatura somática se produce en esta región a partir las denominadas células progenitoras (Ruiz Gomez & Bate, 1997; Ruiz-Gomez *et al.*, 1997) (Figura 5). Estas células mantienen una alta expresión del gen *twist* y se determinan mediante un proceso de inhibición lateral mediado por factores neurogénicos (Carmena *et al.*, 1995). Cada una de estas células progenitoras se divide en dos células fundadoras o bien en una célula fundadora y una célula precursora de un músculo del adulto (Carmena *et al.*, 1995; Ruiz Gomez & Bate, 1997). El resto de las células que mantienen una alta expresión del gen *twist* se determinan a mioblastos capaces de fusionarse con las células fundadoras y, así, se forma el sincitio precursor de cada músculo individual (Bate & Martinez Arias, 1993). Toda la información necesaria para la formación de cada músculo individual se encuentra determinada en las células fundadoras (Rushton *et al.*, 1995). En los últimos años se ha descubierto un gran número de genes implicados en el proceso de fusión (Paululat *et al.*, 1999a; Paululat *et al.*, 1999b; Taylor, 2002).

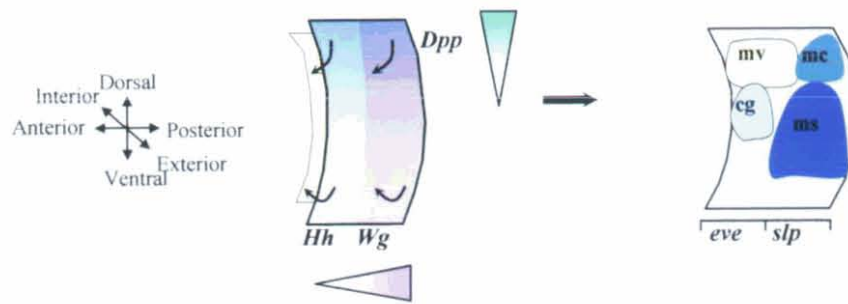


Figura 4. Subdivisión del mesodermo en *Drosophila*. Representación esquemática de las distintas señales involucradas en la subdivisión del mesodermo. El mesodermo (amarillo) recibe diferentes señales del ectodermo. Las células ectodérmicas dorsales expresan *decapentaplegic* (*Dpp*, verde). Las células mesodérmicas dorsales que reciben la señal de *Dpp* y *Hedgehog* (*Hh*, azul claro) del ectodermo van a formar el mesodermo visceral (*mv*) en el dominio funcional de *even-skipped* (*eve*) mientras que las células ventrales que no reciben la señal de *Dpp* van a formar el cuerpo graso (*cg*) y otros tejidos mesodérmicos. Por otro lado, las células mesodérmicas dorsales en el dominio funcional de *sloppy-paired* (*slp*) que están bajo la influencia de *Wingless* (*Wg*, morado) y *Dpp* van a formar la musculatura cardíaca (*mc*). El resto de las células en el dominio *slp* van a formar la musculatura somática (*ms*). Esquema adaptado de Baylies et al., 1998.

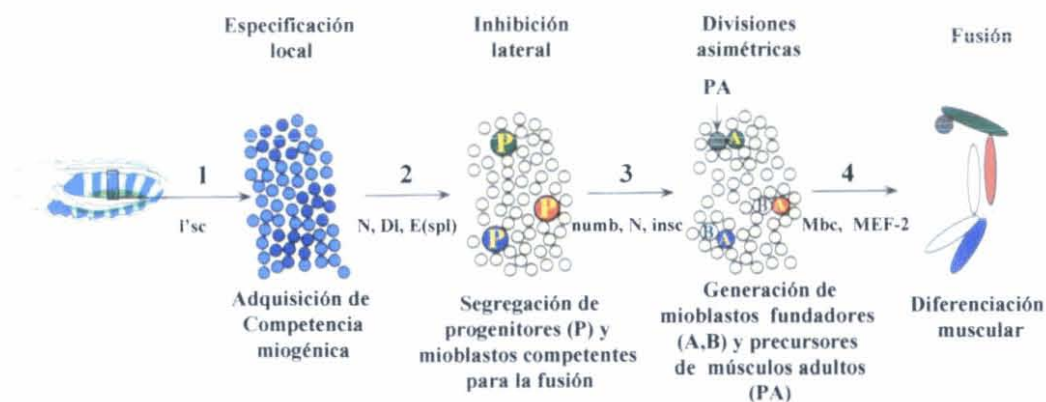


Figura 5. Formación del patrón muscular embrionario de *Drosophila*. Esquema de un embrión de estadio 10 mostrando la expresión modulada del gen *twist*. Las células que expresan fuertemente *Twist* (azul medio) van a dar lugar a todos los músculos somáticos. (1) La expresión del gen proneural *lethal of scute* (*l'sc*) en el dominio de fuerte expresión de *Twist* marca grupos de células mesodérmicas (círculos azul oscuro) que tienen el potencial de ser progenitores musculares. (2) Mediante un proceso de inhibición lateral mediada por genes neurogénicos se restringe la expresión de *l'sc* a células individuales que se convierten en progenitores musculares (P). El resto de las células pasa a ser mioblastos competentes para la fusión. (3) La división asimétrica de los progenitores da lugar a dos células fundadoras o a una fundadora y a un precursor de músculo adulto (PA). En cualquier caso, las dos células hermanas toman diferentes destinos. (4) Cada fundador va a dar lugar a la formación de un músculo específico al fusionarse con mioblastos competentes para la fusión. Esquema tomado de Baylies et al., 1998.

En todo el proceso de formación de los músculos larvarios, además de Twist, hay otro factor de transcripción miogénico que juega un papel esencial, este factor es MEF2 (Black & Olson, 1998; Lilly *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994). En vertebrados, donde fue descrito inicialmente, forma parte de una familia de factores de transcripción compuesta por cuatro genes (Goosset *et al.*, 1989), que juegan también un papel esencial a través de su unión a la secuencia CTAAATATG (Buckingham, 1994; Olson & Klein, 1994). En *Drosophila*, el gen *Dmef2* se expresa, durante la diferenciación, en todos los linajes celulares que van a dar lugar a la formación de estructuras musculares (Taylor, 1998). La eliminación del gen genera la carencia total de músculos en el embrión, pero las células fundadoras se localizan en cambio correctamente (Lilly *et al.*, 1995; Ranganayakulu *et al.*, 1995). Asimismo, la expresión ectópica de la proteína MEF2 en la epidermis del embrión induce la expresión de genes específicos musculares (Lin *et al.*, 1997a). Por otra parte, se ha demostrado que el gen *Dmef2* juega un papel importante en la determinación de las células que van a dar origen al corazón del animal (Gajewski *et al.*, 1997). *tinman*, el homólogo de *NK2.5* en vertebrados, que es un gen esencial en la formación del conducto dorsal o corazón (Azpiazu & Frasch, 1993; Bodmer, 1993), es un activador directo de *Dmef2* (Gajewski *et al.*, 1997).

En la formación *de novo* de ciertos músculos adultos intervienen las células precursoras anteriormente descritas, que son determinadas durante la diferenciación de la musculatura somática en el embrión. En esta etapa, sin embargo, estas células no diferencian pero siguen expresando el gen *twist*, proliferan y se mantienen asociadas a los discos imaginales (Ruiz Gomez & Bate, 1997). Tras el proceso de histólisis, en estas células, Twist activa el gen *Dmef2* y, éste a su vez, es el responsable último de la formación de los músculos del adulto (Cripps *et al.*, 1998). Los mioblastos que se encuentran en el disco de ala dan lugar a los músculos indirectos de vuelo dorso-ventrales (DVM-IFM); los mioblastos situados en el disco de pata originan los músculos de salto (TDT) (Bate & Arias, 1991; Fernandes *et al.*, 1991) y los situados en los de ojo-antena, cibarial y labial originan los músculos cefálicos (Raghavan & Pinto, 1985). Un segundo grupo de músculos adultos que se forma también *de novo*, son algunos de los músculos abdominales (Bate & Arias, 1991; Currie & Bate, 1991). En este caso, los mioblastos migran hasta la región abdominal

y se fusionan entre ellos por asociación con los nervios en crecimiento (Currie & Bate, 1991) para dar lugar a la fibra muscular. Por último, los músculos indirectos de vuelo dorso-longitudinales (DLM-IFM) y los hipodérmicos abdominales temporales se desarrollan utilizando como precursores el conjunto de músculos larvarios que no fueron histolizados (Crossley, 1978). Estos precursores sufren un proceso de duplicación y sobre la estructura resultante se fusionan mioblastos originados en el disco de ala (Fernandes *et al.*, 1991). Al menos en el caso de los DLMs, este proceso es, al igual que en los músculos formados *de novo*, dependiente de la función de Twist que ejerce esta función mediante la activación del gen *Dmef2* (Cripps *et al.*, 1998).

5.2. Regulación de los genes musculares estructurales

La formación de los distintos músculos, con propiedades fisiológicas, metabólicas y contráctiles específicas, es un proceso complejo que se produce en varias etapas durante el desarrollo y que implica múltiples mecanismos de regulación (Hughes & Salinas, 1999; McKinsey *et al.*, 2002; Stockdale, 1997). En el proceso, se produce la activación rápida y coordinada de los genes que codifican las proteínas musculares. El ensamblaje de sus productos va a producir la formación de los sarcómeros en la célula muscular (Buckingham *et al.*, 1992). En la formación del músculo, los genes que codifican las proteínas sarcoméricas, como la Actina, las Troponinas T, I y C, la Tropomiosina, la Miosina o la Paramiosina se activan en un período muy corto de tiempo. Además, las proteínas musculares se acumulan en cantidades diferentes en las fibras pero siempre, manteniendo una estequiometría muy precisa en cada tipo de músculo. El mantenimiento de esta estequiometría es esencial para mantener la integridad funcional de cada fibra muscular. También, las isoformas presentes en los distintos tipos musculares de un organismo varían, siendo en la mayor parte de los casos específicas de tipo muscular. La diferencia en las propiedades contráctiles y bioquímicas de cada fibra produce una activación selectiva de la expresión de las isoformas específicas de cada tipo muscular. El mecanismo más importante de la célula, que hoy se conoce, implicado en este proceso es la regulación de la transcripción. La transcripción en muchos de estos genes está regulada por secuencias de DNA, también denominadas elementos de regulación en *cis*, que contienen activadores

(*enhancers*) o represores que interaccionan con combinaciones únicas de factores de transcripción en cada tipo celular consiguiendo que se active o se reprima la expresión de determinados genes.

La expresión de genes específicos de tejido suele estar regulada por dos o más regiones. Generalmente, existe una región próximal, respecto al nucleótido de inicio de la transcripción, capaz de dirigir sólo una expresión basal, y una o más regiones distales en las que se localizan activadores y represores que dan al promotor su capacidad para dirigir una expresión diferencial, espacial, temporal, o ambas a niveles normales (Arnone & Davidson, 1997). En los últimos años se ha producido un gran avance en cuanto al conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión de los genes musculares estructurales (Arnone & Davidson, 1997; Buonanno & Rosenthal, 1996; Hughes & Salinas, 1999; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004; Schiaffino & Reggiani, 1996). En las regiones que regulan la expresión de estos genes se suelen localizar distintas combinaciones de motivos de unión a factores de transcripción miogénicos. En todos los casos se ha descrito la presencia de, al menos, uno o varios sitios MEF2 y cajas E (Black & Olson, 1998). También juegan un papel importante, Tinman (Nkx2.5), Bagpipe, CF2, PDP1 o Biniou (Azpiazu & Frasch, 1993; Bagni *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 1997b; Reddy *et al.*, 2000; Zaffran *et al.*, 2001). La importancia funcional de los motivos de unión a factores miogénicos, y también del número y configuración espacial dentro de *enhancers*, ha sido descrita en distintos modelos (Frith *et al.*, 2001).

Estudios recientes de nuestro laboratorio y del Dr. A. Ferrús (Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004) han demostrado que la expresión de los genes *TnT* y *TnI* de *Drosophila* está controlada por dos regiones reguladoras diferentes, ambas con una organización modular. Estas dos regiones reguladoras que se han denominado URE (Upstream Regulatory Element) e IRE (Intronic Regulatory Element) están situadas en la región 5' y en el intrón 1 respectivamente y son funcionalmente idénticas pero no son redundantes. En cada una de estas regiones hay varios módulos conservados que son esenciales para alcanzar los niveles adecuados de expresión en cada tipo de fibra muscular. En el gen de la cadena pesada de la miosina y en el gen *Tm 2* también se ha descrito la presencia de elementos reguladores de la transcripción en el intrón 1 (Gremke *et al.*, 1993; Hess, 1989). Hasta el momento no se han realizado análisis funcionales de la región 5' en ninguno de

estos genes pero el análisis *in silico* realizado en nuestro laboratorio del gen de la *Tm 2* indica que esta región existen varios elementos conservados en otras especies de *Drosophila* con sitios de unión para los factores miogénicos mencionados y siguiendo una distribución modular parecida a la de los elementos URE de los genes *TnT* y *TnI*.

De la familia génica de la actina, compuesta por seis genes, se conoce la localización de los elementos reguladores que controlan la expresión de dos de ellos, los genes de la *actina 57B* y de la *actina 88F*. La Actina 57B es embrionaria y su expresión está regulada por 600 pb situadas en la región 5' proximal del inicio de la transcripción (Kelly *et al.*, 2002). Esta secuencia contiene un sitio MEF2 funcionalmente importante. La expresión de la Actina 88F que es específica, casi exclusivamente de IFM, está controlada por elementos localizados dentro de la primera kilobase de la región 5' flanqueante del gen (Geyer & Fyrberg, 1986).

En mamíferos, los genes *Tnlf*, *Tnls* que codifican las isoformas de la TnI específicas de las fibras de contracción rápida y de las de contracción lenta respectivamente, contienen regiones reguladoras en la región 5' (URE) o en regiones intrónicas (IRE) (Banerjee-Basu & Buonanno, 1993; Calvo *et al.*, 2001; Hallauer & Hastings, 2002). También, según muestra un análisis *in silico*, en los seis miembros de la familia MHC de músculo esquelético humano las regiones reguladoras presentan una organización modular conservada (Konig *et al.*, 2002).

Por tanto, la existencia de varias regiones reguladoras organizadas en módulos que contienen distintas combinaciones de sitios de unión para factores de transcripción miogénicos es una característica común en prácticamente todos los genes musculares estructurales estudiados tanto en *Drosophila* como en vertebrados.

5.3 Regulación del gen de la *paramiosina/miniparamiosina*

El gen *paramiosina/miniparamiosina* de *Drosophila* está situado en una región de aproximadamente 17 kb localizada en la banda 66D14 (Maroto *et al.*, 1995). La PM está codificada por 9 exones mientras que la mPM está codificada únicamente por tres (Figura 6). El exón 1b, exclusivo de la mPM, se localiza en el intrón 7 del gen. Los dos últimos exones, 8 y 9, están compartidos por las dos proteínas. Todos los exones del gen son

codificantes. Esta estructura, en la que un solo gen codifica dos proteínas diferentes se ha descrito en otros dos genes musculares, los de la *mhc* (Standiford *et al.*, 1997) y la *Tm 2* (Hanke & Storti, 1988). Las segundas proteínas codificadas por estos genes son la MRP (*Myosin Rod Protein*) que aunque se expresa en todos los músculos, su expresión es mayoritaria en un grupo de DLM, y la forma citoplásmica de la *Tm 2* respectivamente.

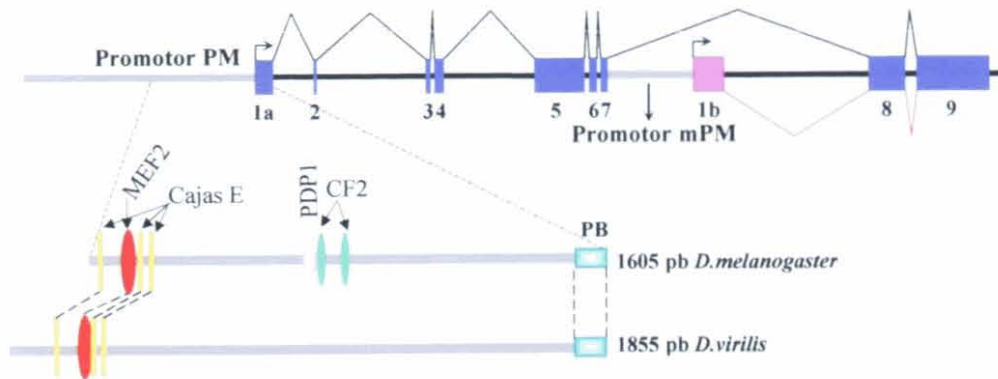
El patrón de expresión espacio-temporal de la PM y la mPM depende de dos promotores diferentes que están situados en la región 5' respecto del inicio de la transcripción de los respectivos mRNAs. (Arredondo *et al.*, 2001a; Maroto *et al.*, 1995). Estos dos promotores funcionan de forma totalmente independiente. No comparten regiones reguladoras de la transcripción y la actividad de cada uno de ellos no se ve influenciada por la actividad del otro cuando ambas proteínas se expresan en la misma fibra muscular (Arredondo *et al.*, 2001a). En la región próxima a los inicios de la transcripción, en ambos promotores, existen unas 100 pb conservadas en más de un 99% que deben corresponder al sitio de unión de la maquinaria basal (Figura 6).

Estudios previos del laboratorio identificaron algunos de los elementos que controlan la correcta expresión espacio-temporal de la PM. Los elementos identificados se encuentran entre los nucleótidos -1700 y -900 respecto al inicio de la transcripción de la PM (Arredondo *et al.*, 2001a)(Figura 6A). Dentro de este fragmento se identificó una región, localizada entre -1.7 y -1.4 kb, que contenía un sitio MEF2 y tres cajas E conservadas en *D. virilis* (Figura 6A). El sitio MEF2 es esencial para la expresión de la proteína en larvas, en cambio, en adultos contribuye a aumentar los niveles de expresión y a la especificidad muscular. Sin embargo, la reducción de los niveles de expresión, al mutar el sitio MEF2 es menor que cuando se elimina la región conservada completa. La región comprendida entre -1.4 y -0.9 kb también parecía desempeñar una función en la expresión de la PM, ya que el fragmento de 1.4 kb es capaz de dirigir la expresión del gen *LacZ* en todos los músculos aunque a niveles muy bajos. Esta expresión desaparece al eliminar el fragmento comprendido entre -1.4 y -0.9 kb (Arredondo *et al.*, 2001a). En esta región se han localizado varios fragmentos conservados en *D. virilis*, un sitio de unión para el factor PDP1 y dos sitios para factor CF2 que no están conservados, pero que son capaces

de unir estas proteínas *in vitro*. Estos dos factores de transcripción están involucrados en la diferenciación terminal del músculo (Bagni *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2000), concretamente PDP1 participa en la regulación de la transcripción del gen *Tm 2* (Lin *et al.*, 1997b).

En el caso de la mPM, en la región que regula su expresión se han localizado tres elementos o módulos funcionalmente activos que tienen una gran conservación en *D. virilis*. Estos módulos se han denominado AB, BF y TX (Arredondo *et al.*, 2001a) (Figura 6B). Con la excepción de alguna caja E, en ninguno de estos elementos se han encontrado secuencias consenso para factores de transcripción conocidos, destacando sobre todo la ausencia de sitios de unión para MEF2. Una característica común de prácticamente todas las regiones reguladoras de genes musculares estructurales estudiadas es la presencia de uno o más sitios MEF2 que son críticos para su función. Casi todos estos genes se expresan tanto en los músculos embrionarios/larvarios como en los de adulto. Es posible que la expresión de genes específicos de músculos adultos no dependa directamente de MEF2.

A



B

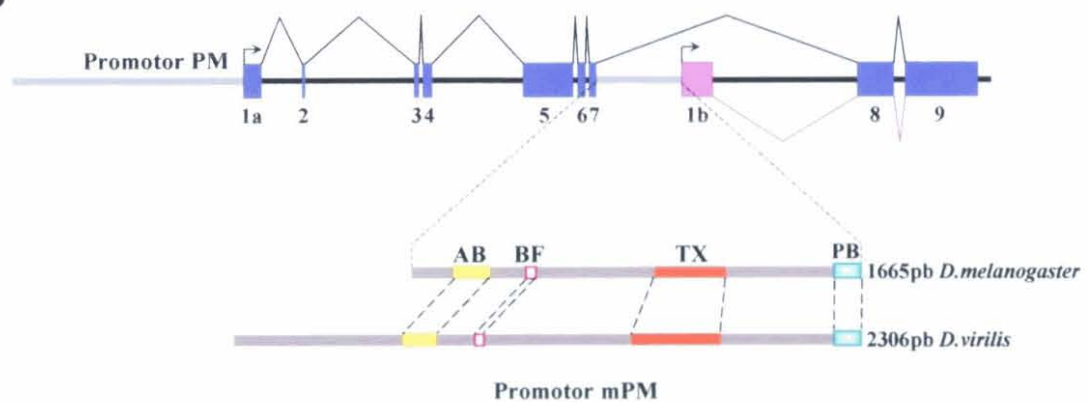


Figura 6. Gen paramiosina/miniparamiosina. Regiones reguladoras. **A** El gen paramiosina/miniparamiosina está compuesto por 10 exones de los cuales todos, excepto el exón 1b, codifican la paramiosina. El promotor que regula la expresión de la paramiosina se localiza en la región 5' flanqueante del gen. En la figura se muestran las regiones conservadas entre *D. melanogaster* y *D. virilis*. Existe una alta conservación de las 100pb correspondientes al promotor basal (PB, rectángulo verde) y de una región distal que contiene un sitio de unión para MEF2 y tres cajas E (región MEF-E). **B** El promotor que regula la expresión de la miniparamiosina, codificada por los exones 1b, 8 y 9, se localiza en el intrón 7 del gen. En este intrón, a parte de las 100pb correspondientes al promotor basal (PB, rectángulo verde), se han localizado tres elementos de secuencia, denominados AB, BF y TX, que presentan una alta conservación entre *D. melanogaster* y *D. virilis*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Durante los últimos años el interés de nuestro grupo se ha centrado en la caracterización de los mecanismos moleculares implicados en la regulación y la función de los genes musculares en *Drosophila melanogaster*. En concreto, los objetivos de esta Tesis doctoral han sido los siguientes:

- Caracterización de los elementos implicados en la transcripción de la Paramiosina:

- 1) Establecer el papel funcional de las cajas E situadas junto a un sitio MEF2 en la región distal del promotor que controla la expresión de la Paramiosina.
- 2) Caracterizar la función individual de la región que contiene estas cajas E y el sitio MEF2 e identificar nuevos elementos implicados en la regulación de la expresión de la Paramiosina.
- 3) Establecer la interrelación funcional entre los distintos elementos que controlan la expresión de la Paramiosina.
- 4) Análisis comparativo de los elementos reguladores y su organización dentro del promotor con la de otros promotores que controlan la expresión de proteínas musculares.

- Caracterización de los elementos implicados en la transcripción de la Miniparamiosina:

- 1) Análisis in vivo de la función individual de los elementos AB, TX y BF situados en la región que controla la expresión de la Miniparamiosina.
- 2) Establecer la interrelación funcional entre AB, TX y BF.
- 3) Identificar los factores de transcripción que interacción con estos módulos y su posible papel funcional.

- Estudio funcional de la proteína muscular Troponina T:

- 1) Analizar los efectos producidos por la sobreexpresión de la Troponina T en los músculos indirectos de vuelo.
- 2) Establecer correlaciones entre los fenotipos obtenidos y la función.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

La composición de la mayoría de los tampones y soluciones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de métodos o en las citas correspondientes. Todos los reactivos utilizados en la experimentación fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular. El origen específico de muchos de los productos empleados se especifica en el texto.

1.1 Líneas de *Drosophila melanogaster*.

En el desarrollo de esta tesis se han utilizado las siguientes líneas de *Drosophila*, además de las generadas a lo largo de la misma:

- **Oregon R**. Cepa silvestre.
- **yellow,white (yw)**. Línea mutante con ojos blancos (*white*) y cuerpo más claro (*yellow*) usada como parental para generar las líneas transgénicas.
- **yw; CyO/Xa/MKRS** y **yw; If/CyO; MKRS/TM6,Tb**. Líneas mutantes usadas para determinar el cromosoma de inserción y estabilizar las inserciones letales.
- **mP1.7**. Línea transformante que expresa el gen *LacZ* bajo el control del intrón 7 del gen PM/mPM. Amablemente cedida por el Dr. S. Bernstein.
- **w;Pdp1^{P205}/TM6C, Sb,Tb**. Línea mutante de Pdp1 (Cyran *et al.*, 2003).

1.2 Cepas bacterianas.

Para la transformación y crecimiento de plásmidos en general se utilizó la cepa de *E. Coli* DH5 α , cuyo genotipo describe Sambrook y colaboradores (Sambrook & Russell, 2001).

1.3 Cepas de levadura.

Para el rastreo de la genoteca de cDNA de *D.melanogaster* por el método de “Un Híbrido” se utilizó la cepa de *S.cerevisiae* YM4271 (MATa, ura3, his3, ade2, lys2, leu2,

trp1, tyr1) (Clontech) amablemente cedida por el Dr. Francisco Portillo.

1.4 Genoteca de cDNA de *Drosophila melanogaster* utilizada en el rastreo de “Un Híbrido”.

El rastreo se realizó usando una genoteca de cDNA de adultos de *Drosophila melanogaster* fusionados al dominio de activación de GAL4 en el plásmido pGAD10 (Clontech).

1.5 Plásmidos.

1.5.1 Vectores de clonaje.

- **pGEM-T** (Promega). Utilizado en el clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.
- **pGEM-T easy** (Promega). Vector utilizado en el clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR.
- **pCaSpeR β -gal** (Thummel *et al.*, 1988). Vector derivado de un elemento P. Permite la inserción de fragmentos específicos de DNA en el genoma de *Drosophila*. Utilizado para el análisis *in vivo* de regiones reguladoras. Lleva los extremos 5' y 3' de un elemento P, el gen *white* para seleccionar las moscas transformantes por el color de ojos y el gen *LacZ* como marcador.
- **pH-Pelican** (Barolo *et al.*, 2000). Vector derivado de un elemento P. Utilizado para el análisis *in vivo* de regiones reguladoras. Lleva además de lo descrito para el vector anterior el promotor basal de Hsp70 y secuencias aisladoras (*insulators*) que evitan las posibles influencias sobre la expresión del transgén de secuencias reguladoras próximas al sitio de inserción.
- **pCaSpeR 4** (Thummel *et al.*, 1988). Vector derivado de un elemento P. Utilizado para la inserción en el genoma de *Drosophila* de cualquier DNA. Contiene los extremos de un elemento P y el gen de selección *white*.
- **pHISi** (Clontech). Vector utilizado en la estrategia de “Un Híbrido”.

1.5.2 Vectores de expresión.

- **pSPUTK PDP 1.** Expresión de PDP 1. Amablemente cedido por el Dr. R.V. Storti (Lin *et al.*, 1997b).
- **pUChs π Δ 2-3.** Plásmido que aporta la expresión de la transposasa en la generación de moscas transgénicas por transposición de elementos P. Se coinyecta en embriones de *Drosophila* junto a las construcciones realizadas en vectores derivados de elementos P. Amablemente cedido por el Dr Manuel Calleja.

1.5.3 Plásmidos utilizados en la construcción de otros plásmidos.

- **4PM.** Contiene 4 kb de la región 5' del gen PM/mPM de *D.melanogaster* en el vector pCaSpeR- β -gal (Arredondo *et al.*, 2001a).
- **1.7PM.** Contiene 1,7 kb de la región 5' del gen PM/mPM en el vector pCaSpeR β -gal (Arredondo *et al.*, 2001a).
- **mP2.7.** Contiene un fragmento de 2,7 kb del gen PM/mPM, desde el intrón 4 hasta el inicio del exón 1b, clonado en fase con el gen *LacZ* en el vector pCaSpeR- β -gal.
- **TX:pWhsp70Lac.** Tiene el elemento conservado TX del intrón 7 del gen PM/mPM en el vector pWhsp70Lac.
- **pUD88F7/-Cys.** Plásmido del que se extrajo el promotor de la Actina 88F para las construcciones utilizadas en la sobreexpresión de la TnT en IFM. Amablemente cedido por el Dr. J.Sparrow.
- **pBLS TnT.** Plásmido pBlueScript que contiene el cDNA correspondiente a la isoforma de IFM de la TnT (Benoist *et al.*, 1998).

1.6 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Isogen. En las siguientes tablas se especifica el nombre, la secuencia en la cadena codificante, las dianas para enzimas de restricción en caso de poseerlas y la aplicación principal para la que

fueron diseñados. En negrita se destacan las mutaciones introducidas en caso de haberlas. No se incluyen los oligonucleótidos generales T3, T7 y Sp6.

1.6.1 Oligonucleótidos utilizados en el estudio del promotor de la Paramiosina.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Diana	Aplicación
-2295Pm5'	CGATGAATTCTAAAGCTGAAGTCGA	EcoRI	PCR
-1708Pm5'	GGCCGGTACCCATAAAATAAAATAAGTTAT	KpnI	PCR
-1387Pm3'	ACGAGAATTTTCACTCCAACTCGAGGGCC	XhoI	PCR
-1156Pm3'	CAGACTGCTGTCCGCACGGCCTCGAGGGCC	XhoI	PCR
-758Pm3'	CTTAAATGTATTCAATATTCCTCGAGGGCC	XhoI	PCR
E1m+ E1m-	GTTGGCCT GAGGAG AAATGTGTG CACACATTTCT TCCTC AGGCCAAC	----- -----	Mutagénesis de la caja E1 por PCR
E2m+ E2m-	TAGTTAGG GAAAA GTGTGTTTGT ACAAACACACTTTT CCCTA ACTA	----- -----	Mutagénesis de la caja E2 por PCR
E3m+ E3m-	GTGGAGCAGAGG AGGAG GCGATC GATCGCCT TCCTC CTGTGCTCCAC	----- -----	Mutagénesis de la caja E3 por PCR
*LacZ +	ATACTGTCGTCGTCCCTCAAACCT	-----	RT-PCR
*LacZ -	GCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATG	-----	RT-PCR
Pr.min.Pm +	GGCAAGCTCTAGAGCAAACCTAG	XbaI	Secuenciación
*pCaSpeR +	TAAGTGCGAGTGAAAGGAATAG	-----	Secuenciación
*pCaSpeR -	GCTGGCGAAAGGGGGATGTGCT	-----	Secuenciación
*pH-Pelican+	GATCAATTGTGCTCGGCAACA	-----	Secuenciación

Los oligonucleótidos marcados con un asterisco fueron utilizados tanto en el estudio del promotor de la Paramiosina como en el de la Miniparamiosina.

1.6.2 Oligonucleótidos utilizados en el estudio del promotor de la Miniparamiosina.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Diana	Aplicación
5'AB	GACGAATTCACGAAGGTTTTCGTTTC	EcoRI	PCR

Nombre	Secuencia 5'→3'	Diana	Aplicación
3'AB	CAAAAAGCAACGGCATGGATCCATG	BamHI	PCR
5'BF	GGCCGGTACCCCTGATCCCACTGAAGGTTC	KpnI	PCR
3'BF	TCAATCGAGTTGGTGGATCCTG	BamHI	PCR
5'Tx	CCGTCTAGAATCAATCGAGTTGGTGG	XbaI	PCR
3'Tx	ATAGATTTTCGACAAATTTGCTCGAGGGCC	XhoI	PCR
BF+ BF-	CTAGAAAATTGCGCAGTTGCTGTGATTACACAATA CTAGTATTGTGTAATCACAGCAACTGCGCAATTTT	XbaI SpeI	Retardo y Un-híbrido
BF 1°/6+ BF 1°/6-	CTAGAAAAT TCGATT CAGTTGCTGTGATTACACAATA CTAGTATTGTGTAATCACAGCAACT GAATCGA TTT	XbaI SpeI	Retardo
BF 2°/6 + BF 2°/6 -	CTAGAAAATTGCG ACGTG ACTGTGATTACACAATA CTAGTATTGTGTAATCACAG TCACGT CGCAATTTT	XbaI SpeI	Retardo
BF 3°/6 + BF 3°/6 -	CTAGAAAATTGCGCAGTT GGATGCT TTACACAATA CTAGTATTGTGTA AAAGCAT CCAAGTTCGCAATTTT	XbaI SpeI	Retardo
BF 4°/6 + BF 4°/6 -	CTAGAAAATTGCGCAGTTGCTGTG AGATACGA ATA CTAGTATT CGTATCT CACAGCAACTGCGCAATTTT	XbaI SpeI	Retardo
BF 4mt/6 BF 4mt/6	CTAGAAAAT TCGATTACGTGAGATGCTGATACGA ATA CTAGTATT CGTATCAGCATCTCACGTAATCGA TTT	XbaI SpeI	Retardo y Un-híbrido
BFExtmt+ BFExtmt+	CTAGT CT ATTGCGCAGTTGCTGTGATTACAC GTCT CTAG AGACGT GTAATCACAGCAACTGCGCAAT AGA	SpeI XbaI	Retardo y Un-híbrido
pGAD10+	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC		Secuenciación
pGAD10-	AAGTGAACCTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG		Secuenciación

1.6.3 Oligonucleótidos utilizados en la sobreexpresión de la TnT.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Diana	Aplicación
5' TnTAfl III	AACCGTAGACATGTCCGACGATG	AflIII	PCR
E4TnT	GGAGAGGGCGATCCAGAG		PCR
Act 88F 5'	TTCTCAGTGCCGCACTGGC		PCR
Act 88F 3'	CATCGTCACACATCTTGGC		PCR
E1 Act 88F	GTCAACAGGAATCGAACGTGCG		RT-PCR

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Diana	Aplicación
IT TnT 5'	TAGTCGAACCGCAGCATT		RT-PCR
E2-E6 TnT3'	CTCTGGATCGCCCTCTCCTGTGTAC		RT-PCR
E2 TnT 3'	CATGGCTACGGTTTAGGGTTG		RT-PCR
Prom.Act88F	GTGCTCAAATGGACAATAGA		Secuenciación
SV40	GGTTGGAATCTAAAATACAC		Secuenciación

1.7 Sondas utilizadas en hibridación de RNAs unidos a membrana (Northern blot).

- **Sonda LacZ.** Corresponde a las últimas 800 pb del cDNA de la β -galactosidasa.
- **Sonda TnT.** Fragmento de cDNA que contiene del exón 1 al 6 del gen de la TnT.
- **Sonda Act88F.** Corresponde a la región 5' no traducida del gen Act88F.
- **Sonda PM.** Nucleótidos 6-1446 de la secuencia del cDNA de la Paramiosina.
- **Sonda TnI.** Exón 3 del gen de la TnI.
- **Sonda Tm2.** Corresponde a un fragmento de DNA genómico que contiene los exones 2, 3, 4 y 5 del gen de la Tm2.

1.8 Anticuerpos.

- **Anti-PM.** Obtenido en conejo y usado en inmunotransferencias a una dilución 1/1000 (Maroto *et al.*, 1996).
- **Anti-mPM.** Obtenido en conejo y usado en inmunotransferencias 1/1000 (Maroto *et al.*, 1996).
- **Anti-TnT.** Obtenido en conejo y usado en inmunotransferencias 1/5000 (Domingo *et al.*, 1998).
- **Anti-Actina 88F.** Obtenido en conejo y usado en inmunotransferencias 1/1000. Amablemente cedido por el Dr John Sparrow.
- **Anti-PDP 1.** Obtenido en conejo, usado en inmunotransferencias 1/1000 y en ensayos de superretardo a 1/100 o 1/10. Amablemente cedido por el Dr. R.V. Storti.

- **Anti- β -galactosidasa.** Obtenido en conejo y usado en inmunotransferencias e inmunohistoquímica 1/2000 (Cappel).
- **Anti-IgG de conejo.** Obtenido en cabra, marcado con peroxidasa como segundo anticuerpo para inmunotransferencias 1/1000 (Nordic).

2. MÉTODOS

Los métodos generales de biología molecular tales como clonaje, marcaje de sondas radiactivas, técnicas electroforéticas de ácidos nucleicos y de proteínas, análisis de RNAs transferidos a membrana (*Northern blot*), análisis de proteínas transferidas a membrana (*Western blot*), cultivos bacterianos, etc., se realizaron según describen Sambrook y colaboradores (Sambrook & Russell, 2001). Para la cuantificación de la movilidad electroforética de las proteínas en geles de poliacrilamida-SDS se emplearon marcadores de peso molecular preteñidos de Life Technologies, y para DNA en geles de agarosa, marcador “1kb ladder” de Life Technologies.

2.1 Construcciones para el estudio la regulación de la expresión de la PM.

2.1.1 Mutagénesis de las cajas E.

Las mutaciones en todas las cajas E se introdujeron por PCR según describen Innis y colaboradores (Innis *et al.*, 1990). La mutación se introduce en dos reacciones sucesivas de PCR utilizando un par de oligonucleótidos complementarios en los que se incorpora la mutación y otros dos oligonucleótidos externos, uno que anilla en el extremo 5' y otro en el 3' del fragmento que se quiere amplificar. En la primera reacción se mezcla en un tubo el molde sin mutar, el oligonucleótido 5' y el oligonucleótido mutado (-) y en otro lado el mismo molde con el oligonucleótido mutado (+) y el oligonucleótido 3' de modo que se obtienen dos fragmentos, uno con la mutación en el extremo 3' y otro con la mutación en el 5'. En la siguiente reacción de PCR se utilizan como molde estos dos fragmentos ya que tras el paso de desnaturalización y anillamiento van a producirse también fragmentos

híbridos formados por una cadena que lleva la mutación en el extremo 3' y la otra cadena que la lleva en el extremo 5', ya que estos dos extremos son complementarios. Los oligonucleótidos utilizados en esta segunda reacción son los oligonucleótidos de los extremos.

El cambio introducido en las 3 cajas E fue **GANNAG** en lugar de **CANNTG**. Los plásmidos con mutaciones en las cajas E que se generaron para el análisis *in vivo* de las mismas fueron:

- **E2M**. En esta construcción se mutó la secuencia de la caja E localizada en la posición -1461 (E2) con respecto al inicio de la transcripción. Para la mutagénesis se utilizó como molde el plásmido 1,7PM que contiene 1,7 kb del promotor de la PM desde el inicio de la transcripción clonado en pCaSpeR (Arredondo *et al.*, 2001a). Las mutaciones se incorporaron en los oligonucleótidos E2m+ y E2m-. Los oligonucleótidos de los extremos fueron -1708Pm5' y -758Pm3'. Una vez obtenido el fragmento de 950pb con la mutación en E2, se clonó en el vector pGEM-T easy. Esta construcción se digirió con la enzima de restricción HindIII y se ligó con un fragmento HindIII extraído del plásmido pCaSpeR 1,7PM con T4 DNA ligasa. De la construcción resultante se extrajo un fragmento PstI que se clonó finalmente en el plásmido pCaSpeR 1,7PM al que se había eliminado un fragmento PstI similar pero sin la mutación. En estas construcciones se mantuvo siempre el promotor basal homólogo.

- **1/3M**. Las cajas E mutadas en esta construcción son E1 y E3, localizadas en las posiciones -1587 y -1436 respectivamente. La construcción se realizó básicamente como la anterior. El molde y los oligonucleótidos externos utilizados para la PCR fueron los mismos que para la construcción anterior. Los oligonucleótidos utilizados para incorporar las mutaciones fueron: E1m+, E1m- y E3+ y E3-.

- **3EM**. En este plásmido se mutaron las tres cajas E. Se construyó del mismo modo que las construcciones antes descritas.

2.1.2 Construcciones para el estudio de la función de la región MEF-E.

Con objeto de analizar *in vivo* con más detalle la función de la región MEF-E y determinar si constituye un activador (*enhancer*) muscular se hicieron cuatro construcciones en las que se clonaron distintos fragmentos de la región 5' de la PM, delante del promotor mínimo de *hsp70* presente en el vector pH-Pelican (Barolo *et al.*, 2000).

- **(-1.7/-1.4)PM.** Contiene un fragmento de 321 pb que engloba el sitio MEF2 y las tres cajas E (región MEF-E). El fragmento se amplificó por PCR a partir de la construcción 1,7PM utilizando los oligonucleótidos -1708Pm5' y -1387Pm3'. Después se cortó con las enzimas de restricción KpnI y XhoI y se clonó en pH-Pelican cortado con las mismas enzimas.

- **(-1.7/-1.15)PM.** Lleva además de lo clonado en la construcción anterior las siguientes 231 pb en dirección 3'. Se construyó también amplificando por PCR este fragmento a partir de 1,7PM con los oligonucleótidos -1708Pm5' y -1156Pm3'. Tras una digestión con KpnI y XhoI se clonó en pH-Pelican cortado con las mismas enzimas.

- **(-1.7/-0.76)PM.** Contiene un fragmento de 950 pb que incorpora además de lo descrito en la construcción de arriba, dos sitios para el factor de transcripción PDP1 y dos sitios para CF2. El plásmido se construyó de manera similar a los anteriores pero el oligonucleótido 3' utilizado en la PCR fue -758Pm3'.

- **(-2.3/-1.4)PM.** Lleva un fragmento de 908 pb que comienza en el nucleótido -2295 y acaba en el -1385 respecto al inicio de la transcripción. Incluye además de la región MEF-E varios fragmentos que presentan una alta homología con *Drosophila pseudoobscura* entre los que hemos localizado dos nuevos posibles sitios de unión para el factor MEF2. El fragmento se amplificó por PCR a partir de la construcción 4PM, utilizando los oligonucleótidos -2295Pm5', -1387Pm3', se cortó EcoRI/XhoI y se clonó en el vector pH-Pelican cortado del mismo modo.

2.2 Construcciones para el estudio de la regulación de la expresión de la mPM.

Para el analizar *in vivo* si los elementos conservados AB, BF y TX presentes en el promotor de la mPM funcionan como activadores de la expresión en músculos específicos

se realizaron las siguientes construcciones en el vector pH-Pelican (Barolo *et al.*, 2000) para la posterior generación de líneas transgénicas de *Drosophila*.

- **AB.** El módulo AB se amplificó por PCR utilizando como molde la construcción mP2.7 y los oligonucleótidos 5'AB y 3'AB. El fragmento amplificado se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI y se clonó en el vector pH-Pelican cortado con las mismas enzimas.

- **BF.** El elemento BF se amplificó por PCR utilizando el mismo molde que en el caso anterior y los oligonucleótidos 5'BF y 3'BF. Posteriormente se cortó KpnI/BamHI y se clonó en el vector pH-Pelican cortado de la misma manera.

- **TX.** El elemento TX se extrajo por digestión enzimática con XhoI de la construcción TX:pWhsp70Lac, construida en el laboratorio por el Dr. Juan Arredondo, y se clonó en pH-Pelican abierto con la misma enzima.

- **AB-BF.** Un fragmento de 473 pb que incluye los elementos AB y BF se amplificó por PCR a partir del molde mP2.7 (Arredondo *et al.*, 2001a) utilizando los oligonucleótidos 5'AB y 3'BF. Se cortó con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI y se clonó en el vector pH-Pelican digerido igualmente.

- **AB-TX.** El elemento AB se amplificó por PCR utilizando como molde el vector mP2.7 y los oligonucleótidos 5'AB y 3'AB y tras digerirlo con las enzimas EcoRI y BamHI se clonó en la construcción TX:pH-Pelican cortado del mismo modo.

- **BF-TX.** Se amplificó por PCR un fragmento de 779 pb del promotor de la mPM que incluye los elementos BF y TX utilizando el molde mP2.7 y los oligonucleótidos 5'BF y 3'TX. El fragmento se cortó KpnI/XhoI y se clonó en pH-Pelican digerido con las mismas enzimas.

2.3 Construcción de plásmidos para el estudio de la sobreexpresión de la TnT.

- **pCaSpeR Act88F-TnT.** El promotor del gen de la *actina* 88F se extrajo mediante digestión enzimática Sall/NcoI del plásmido pUD88F7/-Cys y se subclonó en pGEM-T abierto con las mismas enzimas. En el plásmido resultante, abierto con las enzimas NcoI/ApaI, se clonó un fragmento de PCR cortado AflIII/ApaI, correspondiente a las 370pb

primeras del cDNA de la TnT específica de IFM al que se incorporó una diana AflIII en el extremo 5' (Benoist *et al.*, 1998). Este fragmento se amplificó por PCR utilizando como molde el plásmido pBLS TnT y los oligonucleótidos 5'TnT Afl III y E4TnT. A continuación, de esta construcción se extrajo un fragmento Sall/SphI que se subclonó en el plásmido pBLS TnT cortado de la misma forma. Este nuevo plásmido se cortó con Sall romando después con Klenow y a continuación se cortó con NotI. El fragmento liberado contiene el promotor y la región 5' no traducida del gen *actina* 88F fusionado en fase con el cDNA de la isoforma específica de IFM de la TnT. Este fragmento se clonó finalmente en pCaSpeR4-SV40 abierto NotI/SpeI como.

2.4 Identificación de factores de transcripción que interaccionan con el elemento BF del promotor de la mPM por el método de “Un Híbrido” en levadura.

Para identificar factores de transcripción que interaccionan con la región BF (32pb) se utilizó el sistema de “UnHíbrido” MATCHMAKER de Clontech.

Los oligonucleótidos de cadena sencilla con la secuencia nativa de BF (BF+ y BF-) o los controles mutados (BFExtMut+ y BFExtMut- o BF4mt/6+ y BF4mt/6-) se anillaron y se fosforilaron con polinucleótido kinasa (Roche). Los oligonucleótidos de doble cadena con dianas para las enzimas SpeI y XbaI en los extremos 5' y 3' respectivamente, se ligaron entre sí en presencia de T4-DNA ligasa para conseguir un multímero de BF o de las versiones mutadas. Se obtuvieron 5 copias unidas en tandem en los tres casos.

Los multímeros se clonaron en el sitio XbaI del vector pHISi, delante del gen HIS3. Con las construcciones en pHISi linearizadas con NcoI se transformó la cepa de *S. cerevisiae* YM4271(MATa, ura3, his3, ade2, lys2, leu2, trp1, tyr1) según el protocolo descrito por Gietz y colaboradores (Gietz *et al.*, 1992). Las colonias transformantes que habían integrado la construcción en el locus URA3 de la cepa YM4271 por recombinación homóloga, se seleccionaron por crecimiento en un medio sin uracilo. Se seleccionó una colonia transformante de cada tipo. La colonia transformada con el cebo (BF) se transformó con una librería de cDNA de adultos de *Drosophila melanogaster* fusionados al dominio de activación de GAL4 (Clontech Matchmaker Library) en el vector pGAD10. Se seleccionaron los clones positivos por crecimiento en un medio -Ura/-Leu/-His

suplementado con 45mM 3-AT (3-Amino-1,2,4-Triazol). El 3-AT es un inhibidor competitivo del producto del gen HIS3 y se utiliza para eliminar el crecimiento debido a la expresión basal de este gen.

Se extrajo el DNA total de los clones de levadura positivos y con éste se transformaron bacterias de la cepa DH5 α para posteriormente aislar de éstas el DNA plasmídico. Los plásmidos aislados se analizaron por digestión con EcoRI y se secuenciaron aquellos que contenían los cDNA de tamaños más repetidos. Las secuencias se compararon con distintos bancos de datos. Con los clones de cDNA analizados se transformó de nuevo la levadura que contenía BF y las dos colonias controles (BFExtMut y BF4mt/6). En BFExtMut están mutados los dos extremos de la región BF mientras que en BF4mt/6 están mutados las 24pb centrales. Serían verdaderos positivos aquellos clones que sólo hacían crecer la levadura con el cebo en un medio -Ura/-Leu/-His con 45mM 3-AT y ninguno de los controles, o los que permitían el crecimiento del cebo y uno solo de los controles.

2.5 Obtención de ácidos nucleicos.

2.5.1 Obtención de RNA.

El RNA se aisló utilizando Trizol (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron embriones, larvas, pupas y adultos de tiempo de desarrollo conocido. Todas las soluciones utilizadas para trabajar con RNA se trataron con 0.1% DEPC. La concentración se determinó midiendo la absorción en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

2.5.2 Obtención de DNAs.

2.5.2.1 Plásmidos de *E. coli*.

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico se utilizó el kit Wizard Miniprep (Promega), mientras que para grandes cantidades se utilizó el método de

lisis alcalina y para la purificación se utilizaron columnas Nucleobond AX-500 (Macherey-Nagel).

2.5.2.2 DNA de *D. melanogaster*.

Para la obtención de DNA de *Drosophila* se homogeneizaron aproximadamente 50 moscas en 500 µl de una solución de 10 mM Tris-ClH pH 7.4, 10 mM EDTA, 60 mM NaCl y 0.5% SDS, se fenolizó la solución y se trató con 10 µg/ml de RNAasa A durante 15' a 37°C. Posteriormente se volvió a fenolizar, para finalmente precipitar el DNA con etanol. El DNA obtenido se resuspendió en agua.

2.5.2.3 DNA de *S.cerevisiae*.

Los clones de levadura seleccionados en el análisis de *Un Híbrido* se crecieron hasta la fase estacionaria en un volumen de 3ml. Se centrifugaron 30s y el precipitado se lavó con H₂O. A continuación, se resuspendió cada cultivo en tampón TEM (Tris-HCl 50mM pH 7,5 EDTA 25mM, β-Mercaptoetanol 1% (v/v)), se añadió 2µl de zymoliasa 100T a 100mg/ml y se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadió 200µl de tampón TCES (Tris-HCl 200mM pH 9.5, EDTA 80mM, SDS1% (v/v)) y se incubó 30 minutos a 65°C. Después se añadió 100µl de KAc 5M, se incubó en hielo 30 minutos y se centrifugó 5 minutos. Se recogió el sobrenadante y se precipitó el DNA con 3,5 volúmenes de NH₄Ac 7,5M:Etanol 1:6. Se centrifugó 10 minutos y una vez seco el precipitado, se resuspendió en 10-20µl de H₂O.

2.5.2.4 Fragmentos amplificados por PCR.

Las amplificaciones se realizaron en un aparato GenAmp PCR System 2700 de Applied-Biosystems. Para las reacciones se utilizaron 1-10 ng de DNA molde, 500 ng de cada oligonucleótido, 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido (Amersham Pharmacia Biotech), 5 µl del tampón de reacción (facilitado por el fabricante) y 0,6 U de enzima Taq polimerasa DyNAzyme (Finnzymes) en un volumen final de 50 µl. El programa de

amplificación básico utilizado (con pequeñas modificaciones según el caso) fue: 94°C/5 min seguido de 30 ciclos de 94°C/30 s; 55°C /30 s; 72°C /30 s, y un último ciclo de elongación de 72°C/5 min.

2.6 Análisis por RT-PCR.

2 µg de RNA total de cada muestra se retrotranscribieron con la transcriptasa en reverso de AMV (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como cebadores se utilizaron hexámeros de secuencia aleatoria (Roche). Una vez finalizada la reacción se utilizaron 1-2µl de ésta para la reacción de PCR.

2.7 Hibridación de RNAs unidos a membranas (Northern blot).

20 µg de RNA total de cada muestra, obtenido a partir de pupas tardías, se separaron en geles de agarosa al 1,5% con formaldehído y se transfirieron a membranas Zeta-Probe GT (Bio-Rad) en un transferidor de vacío modelo 785 de Bio-Rad según las instrucciones del fabricante. Posteriormente las membranas se hibridaron con sondas marcadas con ³²P-αCTP según el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook & Russell, 2001).

2.8 Secuenciación y análisis de las secuencias.

La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Investigaciones Biomédicas

El procesamiento de los resultados de secuenciación, el alineamiento de secuencias, diseño de oligonucleótidos y generación de mapas de restricción se realizó utilizando el programa GeneJockeyII. Las comparaciones de secuencias con las bases de datos del NCBI, ENSEMBL y FLYBASE se realizaron utilizando el programa BLAST. Los alineamientos múltiples se realizaron con la ayuda del programa ClustalW.

La localización de posibles sitios de unión a factores de transcripción se realizó mediante el programa MatInspector V2.2, utilizando la base de datos TRANSFAC (Wingender *et al.*, 2000).

2.9 Obtención de las proteínas.

2.9.1 Extractos nucleares.

Los extractos nucleares se obtuvieron según el protocolo descrito por Sullivan y colaboradores (Sullivan *et al.*, 2000). La concentración de proteínas se midió con el reactivo de Bradford (Bio-Rad) y los extractos se conservaron a -70°C en alícuotas pequeñas.

2.9.2 Expresión de proteínas *in vitro*.

El factor PDP1 para los ensayos de retardo se obtuvo a partir del plásmido pSPUTK PDP1 utilizando el kit de transcripción/traducción *in vitro* “T7-SP6 Coupled Wheat Germ Extract System” (Promega).

2.9.3 Extractos totales.

Moscas enteras o tóraces se homogenizaron directamente en tampón de Laemmli (Laemmli, 1970) en una proporción 1 mosca/20µl de tampón.

2.10 Inmunodetección en membranas (*Western blot*).

Las inmunotransferencias se realizaron esencialmente como describe Sambrook y colaboradores (Sambrook & Russell, 2001). Como reactivo de revelado se utilizó ECL (Pharmacia).

2.11 Ensayo de retardo en gel.

Los oligonucleótidos de cadena doble se marcaron en los extremos con ^{32}P incubando 1h a 37° con la enzima T4 polinucleótido kinasa (Roche) y $25\mu\text{Ci}$ de ^{32}P - γATP (Amersham Pharmacia). El oligonucleótido marcado se purificó con las columnas Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia). Aproximadamente 0.5 ng de la sonda marcada se incubaron con 1 μl de proteína transcrita y traducida *in vitro* ó 5-10 μg de un extracto nuclear en tampón de retardo en gel (60 mM KCl, 2mM MgCl_2 , 10% glicerol, 0.1-5 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM HEPES pH7.9), en un volumen final de 10-15 μl . Como competidor inespecífico se incluyó 1 μg de poli(dI-dC) (Pharmacia). La proteína fue añadida siempre en último lugar. Las incubaciones se realizaron durante 20-30 min en hielo. En los experimentos de competición se añadió a la mezcla de incubación un exceso (100 a 300 veces) del oligonucleótido frío empleado en cada caso. En los experimentos de sobrerretardo se añadió a la mezcla de incubación, después de la adición de la proteína, 1 μl de una dilución 1/100 o 1/10 de suero anti-PDP1 o de suero preinmune de conejo. Los complejos DNA-proteína formados se resolvieron en geles de poliacrilamida al 5% en TBE 0.5X. Posteriormente los geles se secaron y se expusieron a películas autorradiográficas.

2.12 Generación de líneas transgénicas.

Las líneas transgénicas se generaron utilizando la técnica de transformación mediada por elementos P descrita inicialmente por Spradling y Rubin (Spradling & Rubin, 1982). Se microinyectaron embriones de 0 a 45 minutos de la cepa *yw* con una solución que contiene 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la construcción a insertar y 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del plásmido pUCHs $\pi\Delta 2$ -3 que codifica la transposasa, necesaria para la inserción. Cuando los embriones que llegan a la etapa adulta (G0) se cruzan con moscas *yw* y de la descendencia (G1) se seleccionan las moscas transformantes por el color rojo de los ojos. Las moscas transformantes se cruzan entre ellas con el fin de obtener líneas homocigóticas.

2.13 Detección de actividad β -galactosidasa por tinción con X-Gal.

Moscas adultas o pupas fueron incluidas en O.C.T Compound (Sakura) y congeladas en nieve carbónica. Posteriormente, se cortaron en un criostato Jung1800 (Leica) en secciones de 20-25 μ m. Las secciones se depositaron sobre portaobjetos polilisinados (Sigma) y a continuación se fijaron con 4% paraformaldehído en tampón A (10mM NaPO₄ pH 7.2, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂). La actividad β -galactosidasa se analizó por tinción con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) según protocolo descrito por Meredith y Storti (Meredith & Storti, 1993).

Las larvas y abdómenes de adultos enteros se disecaron en tampón A por la región dorsal o la ventral, según los grupos musculares que se quisieran estudiar. Posteriormente, se fijaron y se tiñeron del mismo modo que las secciones.

Los tiempos de incubación para desarrollar el color variaron según el experimento entre aproximadamente 1 hora y toda la noche (16h). Para su observación y fotografiado las muestras fueron lavadas en tampón A y montadas con Mowiol 4-88 (Fluka). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Nikon Eclipse E400 equipado con una cámara digital Olympus DP50.

2.14 Test de vuelo.

Los test de vuelo se realizaron con moscas de un día de edad como describen Vigoreaux y colaboradores (Vigoreaux *et al.*, 1998). Se analizaron una media de 100 moscas de cada genotipo.

RESULTADOS

1. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA PARAMIOSINA/MINIPARAMIOSINA DE *Drosophila melanogaster*.

1.1 Regulación de la transcripción de la Paramiosina

1.1.1 Análisis *in vivo* de la función de las cajas-E de la región MEF-E.

En la región reguladora distal que controla la expresión de la Paramiosina (PM) se han identificado 3 motivos CANNTG o cajas E y un sitio de unión para el factor de transcripción miogénico MEF2, situados a -1587, -1461 y -1436 y -1488 pb respectivamente, del sitio de inicio de la transcripción (Arredondo *et al.*, 2001a). Estos cuatro sitios están conservados en posición y en secuencia en *Drosophila virilis* (Figura 6A). A parte de estas secuencias no se han encontrado en esta región otras que tuvieran homología con *D. virilis*. Esta región, que hemos denominado MEF-E, es esencial para la correcta expresión espacio-temporal de la PM en todos los músculos, excepto en los IFM (Arredondo *et al.*, 2001a). La mutación del sitio MEF2 sobre un fragmento de promotor de 1.7 kb conlleva la práctica abolición de expresión del gen testigo *LacZ* en los músculos de embriones y larvas, mientras que, en los músculos de los adultos se produce sólo una reducción de los niveles de expresión de *LacZ* con respecto a los niveles alcanzados con una construcción del mismo tamaño sin mutación. Sin embargo, la reducción es mayor cuando se elimina la región MEF-E completa. Estos resultados sugerían que las cajas E de la región MEF-E podrían estar jugando un papel importante en la regulación de la expresión de la PM. Las cajas E se caracterizan por unir factores de transcripción de la familia bHLH. Algunos miembros de esta familia juegan un papel central en miogénesis, como por ejemplo la familia MyoD de vertebrados o los factores Nautilus (el homólogo de MyoD) y Twist de *Drosophila* (Abmayr & Keller, 1998; Baylies & Bate, 1996). En vertebrados se ha descrito que los factores de la familia MyoD y el factor MEF2 interaccionan físicamente para activar cooperativamente el programa miogénico (Black & Olson, 1998; Molkenstein *et al.*, 1995). Hasta el momento se desconoce si esto ocurre también en *Drosophila*.

El estudio de la función de las tres cajas E de la región MEF-E en la regulación de la expresión del gen de la PM/mPM se llevó a cabo por transgénesis. Para ello, se generaron líneas transgénicas de *Drosophila* por transformación mediada por elementos P (Spradling & Rubin, 1982) y posteriormente se realizó un análisis de expresión del transgén *LacZ* (β -galactosidasa), en los músculos larvarios y de adultos. En estas líneas, se introdujo un fragmento de 1.7 kb de la región 5' flanqueante del gen con mutaciones en una o varias de las cajas E, dirigiendo la expresión del gen *LacZ*. El fragmento comprendía la secuencia que iba desde el inicio de la transcripción a -1.7 kb, con el fin de mantener el contexto del promotor endógeno (Materiales y Métodos y Figura 7A). Se hicieron tres construcciones diferentes. En una de las construcciones, denominada E2M, se mutó tan sólo la segunda caja E (empezando por el extremo 5') por ser la más próxima al sitio MEF2. En otra construcción se mutaron la primera y la tercera caja (1/3EM) y en la otra se mutaron las tres (3EM). El cambio introducido en todas las cajas E fue de CANNTG a GANNAG (ver Materiales y Métodos). Mediante ensayos de retardo en gel con extractos nucleares de embriones se observó que estas cajas E unían proteína *in vitro* y que la introducción de estas mutaciones impedía la unión de las proteínas (Datos no mostrados). Estas construcciones se microinyectaron en embriones de la cepa mutante de *Drosophila* *yw*. Se obtuvieron tres líneas transgénicas con la construcción E2M, dos con la construcción 1/3EM y tres con la construcción 3EM. En la transformación mediada por elementos P la inserción de las construcciones en el genoma de la mosca se produce al azar, por lo que es importante analizar varias líneas para descartar posibles influencias del entorno sobre la expresión del transgén. Todas estas líneas se estabilizaron en homocigosis.

Los niveles de expresión de β -galactosidasa en estas líneas se determinaron con un ensayo de detección de actividad, según se describe en Materiales y Métodos, en larvas de tercer estadio y en secciones de adultos recién emergidos. En paralelo y como control se analizaron larvas y adultos de la línea PM1.7 (Arredondo *et al.*, 2001a). En estas líneas, la expresión del transgén está dirigida por el fragmento de 1.7 kb sin mutación. Todas las líneas se incubaron en solución de tinción el mismo tiempo (16 horas). Los resultados se muestran en la figura 7B y en la tabla 1.

En larvas de tercer estadio de las líneas que contenían las distintas mutaciones en las cajas E, el análisis de la actividad β -galactosidasa no reveló ninguna diferencia con

respecto a las líneas control PM1.7. Se detectó expresión con un nivel similar en toda la musculatura larvaria y en todas las líneas analizadas (Figura 7B). La mutación en el sitio MEF2, sin embargo, producía una brusca disminución de la expresión de la expresión de *LacZ* en estos músculos (Arredondo *et al.*, 2001a). Este resultado indica que, a diferencia del sitio MEF2, ninguna de las cajas E parece desempeñar una función importante en el estadio larvario.

En adultos, el estudio de la actividad β -galactosidasa en los músculos indirectos de vuelo (IFM), los músculos de salto (depresor tergal del trocánter (TDT)) y los músculos hipodérmicos indicó una situación diferente (Figura 7B). En los adultos de las líneas E2M la expresión observada es muy similar a la detectada en los controles PM1.7, expresándose el transgén en todos los músculos excepto los IFM. Una de las tres líneas obtenidas con esta construcción presenta una expresión más fuerte en todos los músculos, posiblemente por un efecto debido a la posición de la inserción, por lo que sus resultados se han descartado en el cálculo de los niveles medios de expresión (Tabla 1). Sin embargo, los músculos de adultos de las líneas 1/3EM y 3EM muestran una actividad β -galactosidasa similar a las líneas control PM1.7 salvo en los músculos IFM. En las líneas PM1.7 no hay expresión en los IFM y, en cambio, en las líneas 1/3EM y 3EM sí que aparece actividad β -galactosidasa en estos músculos (Figura 7B). En las líneas con el sitio MEF2 mutado también se detecta expresión en los IFM (Arredondo *et al.*, 2001a). Este resultado indica que las cajas E no son esenciales para la expresión en los músculos de adultos pero sí, al menos E1 y E3, son necesarias para la correcta transcripción de la PM en la etapa adulta, ya que su alteración hace que aparezca expresión en IFM. Es posible que se necesite la mutación de al menos dos cajas E para que se observe una desregulación de la expresión del transgén. También podría ocurrir que las cajas E1 y E3 estuvieran reprimiendo la expresión en los IFM. Curiosamente estas dos cajas son exactamente iguales, CAGGTG. Se ha descrito que a estos motivos se unen los represores Snail y Zfh-1, involucrados en la especificación del mesodermo y la diferenciación del músculo somático respectivamente (Ip *et al.*, 1992; Postigo *et al.*, 1999). Estas dos cajas E (E1 y E3), a diferencia de la caja E2, están conservadas, no sólo en *D. virilis*, sino también en *D. pseudoobscura*.

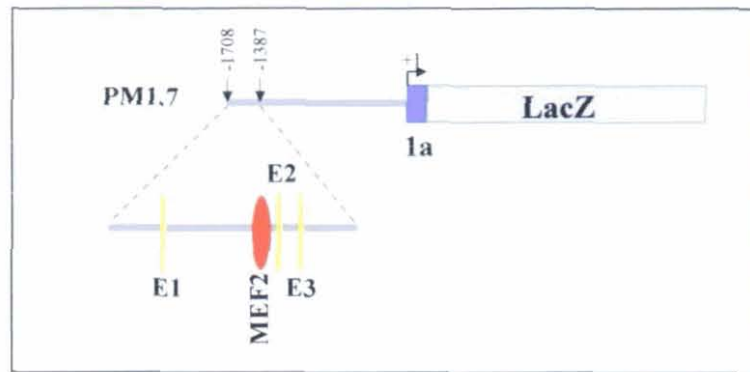
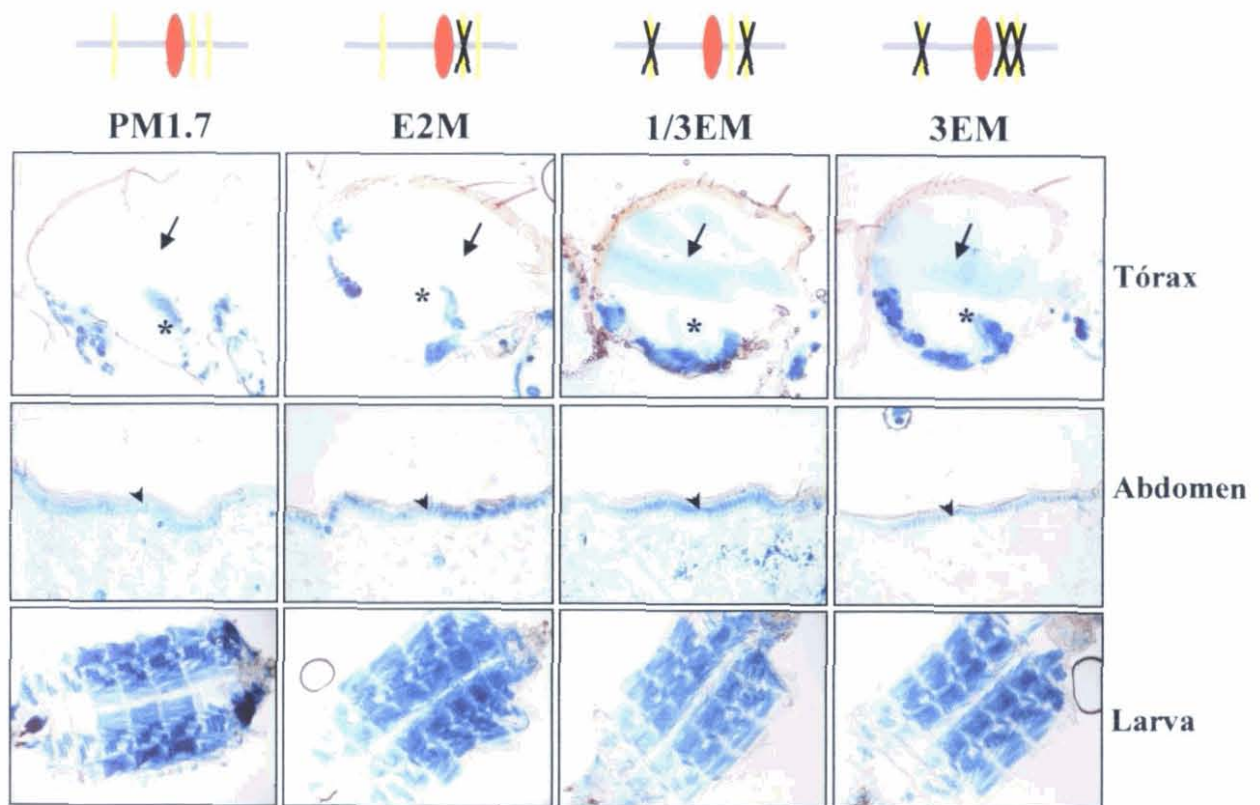
A**B**

Figura 7. Función de las cajas E localizadas en la región MEF-E. Análisis de las líneas transgénicas E2M, 1/3EM 3EM. A. Esquema de la construcción PM1.7 sobre la que se introdujeron las mutaciones en las cajas E y donde se destaca la posición de la región MEF-E. **B.** Detección de actividad β -galactosidasa por tinción con X-gal de tóraces y abdomenes de adultos y de larvas de tercer estadio pertenecientes a las líneas con mutaciones en las cajas E. Las muestras se incubaron en solución de tinción durante 16 horas. Sobre los nombres de cada línea transgénica se muestra un esquema de las mutaciones introducidas en ella. La tinción observada en todas las líneas en los músculos hipodérmicos de las larvas y abdominales es similar a la obtenida en el control PM1.7. Las líneas E2M tampoco muestran diferencias de expresión en los músculos torácicos. Sin embargo, en las líneas 1/3EM Y 3EM se observa tinción también en los IFM. * TDTs, \rightarrow IFM, \blacktriangleright músculos hipodérmicos abdominales.





Expresión de β -galactosidasa								
		Nº Líneas analizadas	Músculos Larvarios	TDT	IFM	Músculos de las patas / DFM	Músculos abdominales	Músculos viscerales
PM1.7		3	++	+	-	++	++	++
E2M		3*	++	+	-	++	++	++
1/3EM		1	++	+	+	++	++	++
3EM	 1.7kb	3	++	+	+	++	++	++

Tabla 1. Comparación de los niveles de expresión de β -galactosidasa entre las diferentes líneas con mutaciones en las cajas E. Se tomaron como referencia los niveles observados en las líneas PM1.7 que expresan el transgén bajo el control del fragmento de 1.7 kb de región reguladora sin mutación. Todas las muestras se incubaron en solución de tinción durante 16 horas. La expresión en todos los músculos, excepto en IFM es similar en las líneas con y sin mutación. En las líneas 1/3EM y 3EM hay una desregulación de la expresión en IFM, ya que aparece tinción en estos músculos.

* 1 de las 3 líneas muestra una expresión muy fuerte del transgén.

1.1.2 Análisis *in vivo* de la funcionalidad de la región MEF-E.

En los estudios de delección realizados con anterioridad en el laboratorio se había demostrado que la región localizada aproximadamente entre -1700 y -1400pb que denominamos región MEF-E, era importante para el control de la expresión de la PM (Arredondo *et al.*, 2001a). Con el fin de completar su caracterización y averiguar si esta región funciona como un activador (*enhancer*) específico de músculo, se generaron tres tipos de líneas transgénicas que expresan el gen bacteriano β -galactosidasa bajo el control de la región MEF-E en tres situaciones diferentes (Figura 8A). En las líneas denominadas (-1.7/-1.4)PM se insertó exclusivamente la región MEF-E de 321pb; en las (-1.7/-1.15)PM, la región MEF-E conteniendo además, las 231pb siguientes en dirección 3' y en las denominadas (-1.7/-0.76)PM la región MEF-E junto con las siguientes 630 pb en dirección 3'. La nomenclatura de las líneas corresponde a las posiciones aproximadas de los nucleótidos iniciales y finales de cada fragmento con respecto al inicio de la transcripción de la PM. Como promotor basal se utilizó un promotor heterólogo, el de *hsp70*. El vector utilizado para la clonación de los fragmentos y posterior generación de estas líneas transgénicas se denomina pH-Pelican (Barolo *et al.*, 2000) e incorpora secuencias aisladoras (*insulators*) que evitan los efectos sobre la expresión del transgén debidos al sitio de inserción. Se obtuvieron cinco líneas con la construcción (-1.7/-1.4)PM, cuatro líneas con(-1.7/-1.15)PM y cinco con la construcción (-1.7/-0.76)PM. Una vez estabilizadas en homocigosis, se analizó la actividad β -galactosidasa en larvas y secciones de adultos de todas las líneas. Los niveles de expresión de β -galactosidasa en las líneas obtenidas con una misma construcción fueron muy similares entre ellas (Figura 8B y Tabla 2).

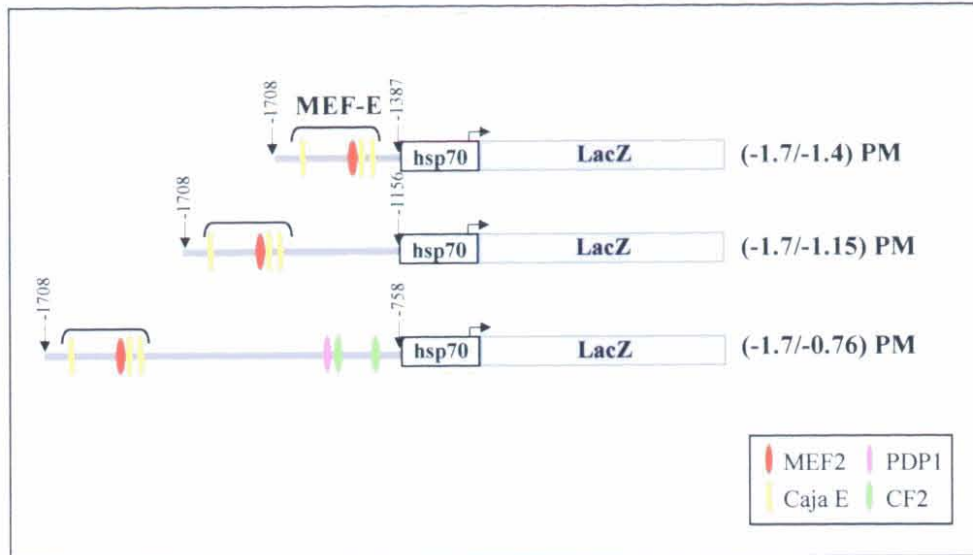
En las líneas (-1.7/-1.4)PM, el fragmento de 321 pb que comprende la región MEF-E dirige la expresión del transgén. La actividad β -galactosidasa en larvas de tercer estadio de estas líneas muestra una expresión alta del transgén en los músculos hipodérmicos pero bastante irregular (Figura 7B). Se observan algunos músculos con una expresión muy fuerte (Figura 8B,★), otros con expresión muy débil y otros que muestran una expresión intermedia. En adultos, en los músculos hipodérmicos del abdomen, la expresión es también bastante fuerte. En el tórax, en cambio, se aprecia expresión en TDT (asterisco), aunque bastante débil, y en los músculos de la patas (Dato no mostrado). En los IFM no

hay expresión (flecha). El patrón de expresión del transgén en los adultos de estas líneas es similar al observado en las líneas PM1.7 en las que la expresión de *LacZ* está dirigida por 1.7 kb de la región 5' flanqueante del gen PM/mPM, aunque sus niveles de expresión son más altos (Arredondo *et al.*, 2001a). Hay que destacar que los niveles de expresión del transgén en los músculos torácicos observados en las líneas (-1.7/-1.4)PM y en las líneas PM1.7 son considerablemente más bajos que en las líneas PM4 (Arredondo *et al.*, 2001a) que llevan 4 kb de la región 5' respecto al inicio de la transcripción de la PM y en la que los niveles se aproximan más a los de expresión de la PM (Becker *et al.*, 1992; Maroto *et al.*, 1996). Estos resultados parecen indicar que la región MEF-E por sí sola es capaz de activar la expresión en todos los músculos del adulto, con la excepción de los IFM. Sin embargo, estos resultados también indican que para obtener una expresión correcta en la etapa larvaria se requiere la presencia de elementos reguladores adicionales.

Las líneas (-1.7/-1.15)PM llevan además de la región MEF-E las siguientes 231 pb en dirección 3'. La expresión del transgén en estas líneas durante la etapa larvaria es más baja y más homogénea que en las líneas (-1.7/-1.4)PM (Figura 8B). Es más parecida a la observada en las líneas PM1.7. Este resultado parece indicar que en este fragmento hay elementos necesarios para la correcta expresión en la musculatura larvaria. En adultos no se observa expresión en los músculos torácicos aunque aparece una expresión, probablemente inespecífica, en los espacios intermusculares. En abdomen, se expresa también en los músculos hipodérmicos pero con una intensidad menor que la observada en las líneas (-1.7/-1.4)PM.

Las líneas (-1.7/-0.76)PM expresan el transgén bajo el control de un fragmento de 950 pb que incluye además de la región MEF-E las siguientes 630pb. En este fragmento se localizan además, un sitio de unión para el factor de transcripción PDP1 y otros dos para CF2 que no están conservados en *D. virilis*. Estos sitios son capaces de unir la proteína transcrita y traducida *in vitro* (Arredondo, 1999). PDP1 y CF2 son dos factores que muestran una distribución ubicua pero que tienen un papel importante en la diferenciación muscular (Bagni *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 1997b; Reddy *et al.*, 2000). En las larvas de estas líneas no se detecta actividad β -galactosidasa (Figura 8B), sugiriendo que en las 400pb añadidas en esta construcción hay elementos que reprimen la expresión en este estadio.

A



B

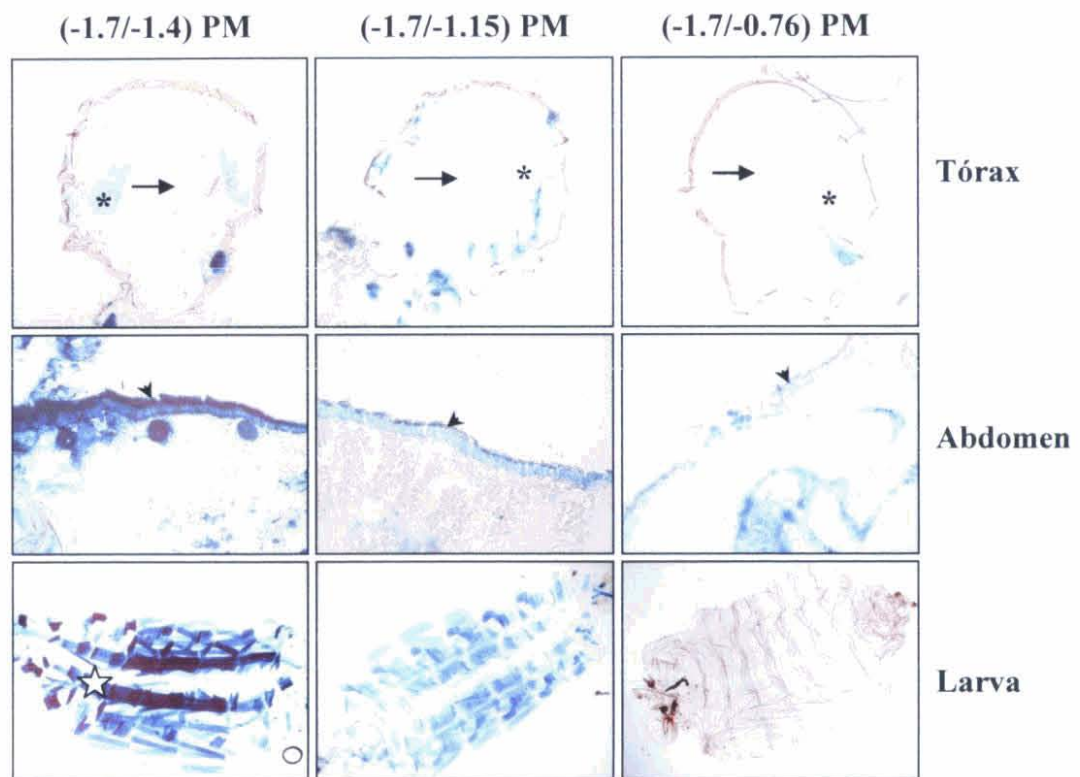


Figura 8. Análisis *in vivo* de la región MEF-E. **A.** Esquema de las construcciones microinyectadas para la generación de las líneas transgénicas donde se indica los nucleótidos de inicio y fin de los fragmentos de la región reguladora clonada. **B.** Comparación de la tinción con X-gal en secciones de tóraxes y abdomenes y en larvas de 3^{er} estadio disecadas de los tres tipos de líneas generadas. Las muestras se incubaron en solución de tinción durante 16 horas. Las líneas con únicamente la región MEF-E, (-1.7/-1.4)PM, reproducen en adultos el mismo patrón de expresión observado en las líneas PM1.7 y PM4. * TDTs, → IFM, ▶ músculos hipodérmicos abdominales. ★ Músculos hipodérmicos larvarios con tinción muy fuerte.

En adultos se sigue observando tinción en los músculos hipodérmicos del abdomen pero con unos niveles menores que en las otras dos líneas. En el tórax se observa tan sólo una ligera tinción en los músculos de las patas y en los músculos directos de vuelo (DFM), no detectándose en TDT (Figura 8B).

La disminución de la expresión del transgén, observada en las líneas (-1.7/-1.15)PM y (-1.7/-0.76)PM probablemente se deba a la presencia, en el fragmento de 630 pb que sigue a la región MEF-E en dirección 3', de elementos reguladores que modulan la actividad de esta región. Esto es consistente con la baja actividad β -galactosidasa detectada en las líneas PM1.4 que carecen de la región MEF-E (Arredondo *et al.*, 2001a). También es posible que la disminución de la expresión de la β -galactosidasa en las líneas (-1.7/-1.15)PM y (-1.7/-0.76)PM se deba al alejamiento de la región MEF-E del promotor basal.

Las diferencias observadas en los niveles expresión del transgén en los músculos torácicos de las líneas (-1.7/-1.4)PM, PM1.7 y PM4 nos hizo preguntarnos si entre los nucleótidos -1708 y -4000 se localizaban elementos en *cis* necesarios para alcanzar unos niveles de expresión adecuados. Para responder a esta pregunta decidimos hacer primero una comparación de esta secuencia con las homólogas en otras especies de *Drosophila* (*footprinting filogenético*). La comparación de las secuencias reguladoras de los genes entre distintas especies es una herramienta muy útil para identificar motivos o regiones que desempeñan funciones importantes en el control de la expresión de los mismos. Los trabajos realizados hasta ahora en el estudio de la regulación del gen PM/mPM estaban basados en el análisis de secuencias conservadas con *Drosophila virilis*. La comparación realizada con esta especie se limitó al fragmento de 1,7 kb de región 5' flanqueante analizado porque era el correspondiente al fragmento de DNA de *D. virilis* clonado y secuenciado en el laboratorio (Arredondo *et al.*, 2001a; Maroto *et al.*, 1995). La reciente secuenciación del genoma de *Drosophila pseudoobscura* nos permitió utilizar esta especie para comparar el fragmento localizado entre los nucleótidos -4000 y -1700. *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura* se separaron en la evolución hace 30 millones de años. Esta comparación reveló la existencia de una región localizada entre los nucleótidos -2295 y -1708 de *D. melanogaster* con varios fragmentos que presentan entre un 90 y un 100% de conservación con *D. pseudoobscura*.

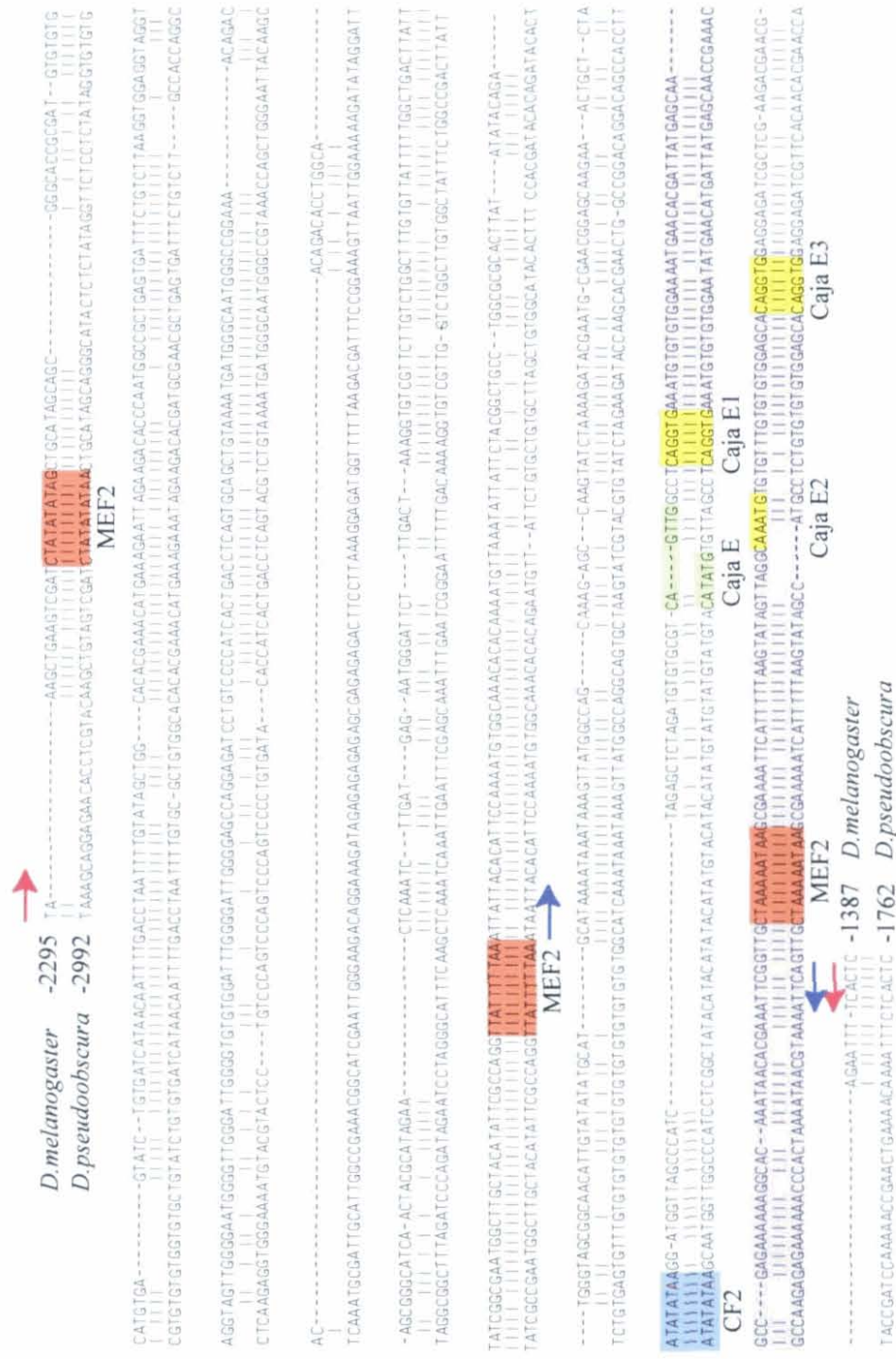


Figura 9. Comparación de las secuencias 5' respecto a la región MEF-E de *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura*. Se destaca en gris el fragmento correspondiente a la región MEF-E (sombreado gris), en rojo los posibles sitios de unión para MEF2 conservados y en amarillo las cajas E de la región MEF-E. La caja E2 no está conservada en *D. pseudoobscura*. Sin embargo, en posición 5' respecto a la caja E1 existe otra caja E en las dos especies aunque los dos nucleótidos centrales no están conservados (sombreada en verde). La caja azul señala un sitio CF2 conservado. Las flechas azules indican el inicio y fin del fragmento de *D. melanogaster* clonado en la construcción (-1.7/-1.4)PM y las rojas el clonado en (-2.3/-1.4)PM

En dos de estos fragmentos cabe destacar la presencia de dos posibles sitios de unión para MEF2 (Figura 9). Las secuencias consenso y flanqueantes de estos dos sitios MEF2 están completamente conservadas. En la región situada entre los nucleótidos -2295 y -4000 no se apreciaron homologías.

Para ver si la región conservada desempeñaba algún papel en la regulación de la transcripción de la PM, se hizo una nueva construcción en la que se puso el transgén bajo el control del fragmento que comprende esta región y la región MEF-E y generamos una nueva línea transgénica que denominamos (-2.3/-1.4)PM (Figura 10A). La actividad β -galactosidasa en esta línea se estudió como en las otras ocasiones en larvas del tercer estadio y secciones de adultos. Tras revelar durante 30 minutos, se visualizó la expresión en los músculos hipodérmicos de larvas y adultos, así como, en los músculos especializados de vuelo y salto del adulto (IFM y TDT). La incubación a tiempos más prolongados en solución de tinción de estas líneas sobresaturaba el sistema e impedía su visualización. La expresión de esta línea se comparó con la de las líneas PM4 y la que portaba sólo la región MEF-E ((-1.7/-1.4)PM). Los resultados se presentan en la figura 10B y en la tabla 2.

En esta línea se observa expresión de β -galactosidasa en los músculos hipodérmicos larvarios, adultos y en TDT, es decir, en los mismos músculos en los que se expresaba en las líneas que llevaban tan sólo la región MEF-E (-1.7/-1.4)PM), tanto en la etapa larvaria como en la adulta, pero los niveles de expresión son considerablemente más elevados. Este resultado confirma la existencia de elementos reguladores en posición 5' de la región MEF-E que son necesarios para alcanzar unos niveles de expresión apropiados. Los niveles de expresión observados en esta línea son superiores a los obtenidos en las líneas PM4 (Figura 10B), probablemente debido a la ausencia de las 1.4kb de región reguladora en dirección 3'.

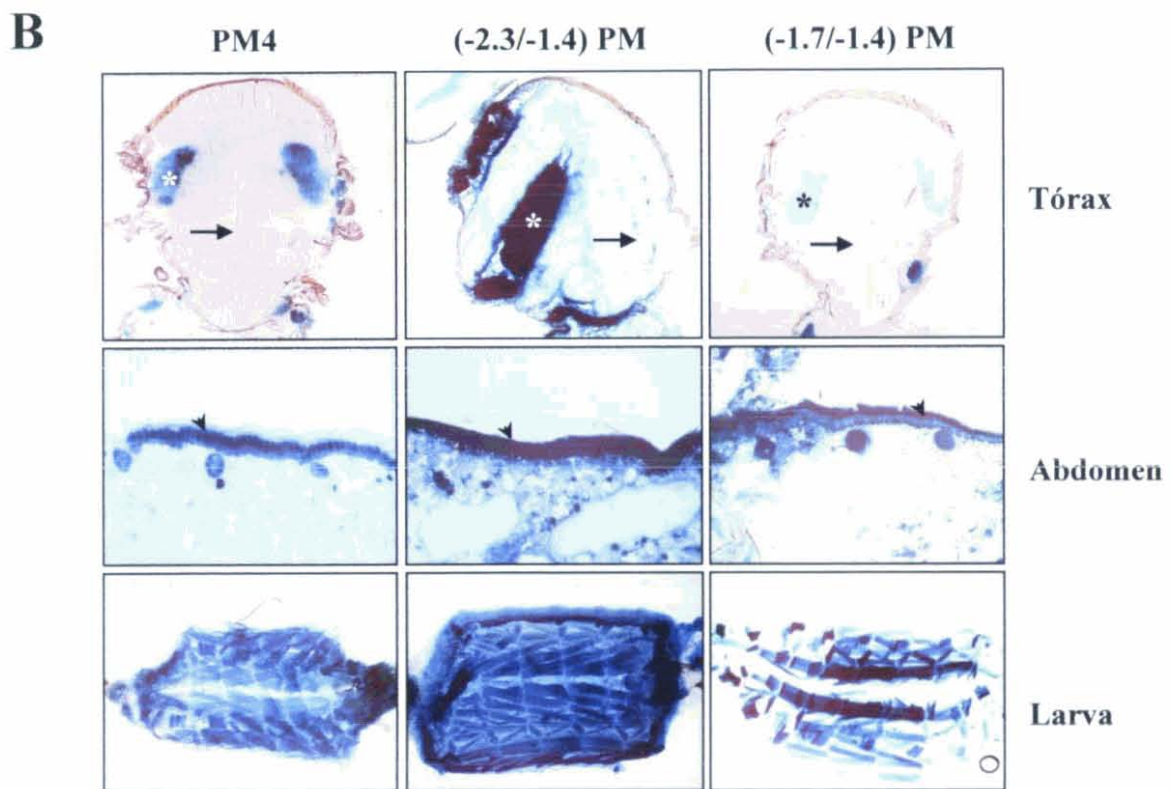
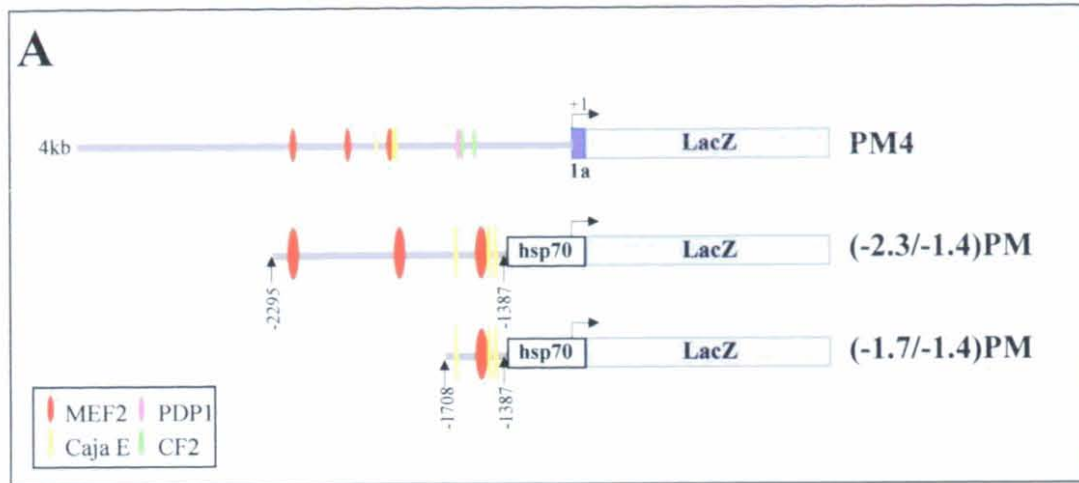
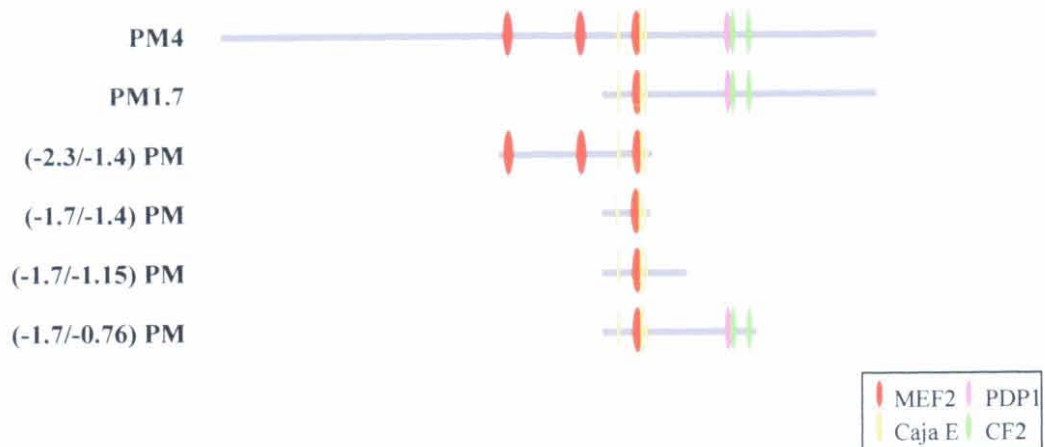


Figura 10. La inclusión de las siguientes 600 pb en dirección 5' de la región MEF-E provoca un gran aumento en los niveles de expresión de la β -galactosidasa. **A** Esquema de las construcciones PM4, (-2.3/-1.4)PM y (-1.7/-1.4)PM. En el esquema de PM4 se muestra la localización del fragmento (-2.3/-1.4) que contiene además de la región MEF-E otros dos posibles sitios de unión para MEF2 conservados en *D. pseudoobscura*. **B** Comparación de los niveles de expresión de la β -galactosidasa en secciones de tóraxes y abdómenes de adultos y en larvas de 3^{er} estadio disecadas, pertenecientes a las líneas PM4, (-2.3/-1.4)PM y (-1.7/-1.4)PM. Las muestras de las líneas PM4 y (-1.7/-1.4)PM se tiñeron durante 16 horas. Las muestras de la línea (-2.3/-1.4)PM se tiñeron durante 30 minutos debido a la fortísima actividad β -galactosidasa que presentaban. * TDTs, → IFM, ► músculos hipodérmicos abdominales.

A



B

Expresión de β -galactosidasa

	N° Líneas analizadas	Músculos Larvarios	TDT	IFM	Músculos de las patas / DFM	Músculos abdominales	Músculos viscerales
PM4	1	+++	+++	-	+++	+++	+++
PM1.7	3	++	+	-	++	++	++
(-2.3/-1.4) PM	1	++++	++++	-	++++	++++	++++
(-1.7/-1.4) PM	5	++/-	+	-	++	+++	+++
(-1.7/-1.15) PM	4	+	-	-	+/-	++	++
(-1.7/-0.76) PM	5	-	-	-	+/-	+	+

Tabla 2. Comparación de los niveles de expresión de β -galactosidasa entre las diferentes líneas generadas para el análisis de la función de la región MEF-E. **A.** Esquema de los distintos fragmentos de región reguladora analizada en cada tipo de línea transgénica. **B.** Comparación de los niveles de expresión de β -galactosidasa entre las diferentes líneas. Todas las muestras, excepto las de (-2.3/-1.4) PM se incubaron en solución de tinción durante 16h. Las muestras de (-2.3/-1.4) PM se tiñeron durante 30 minutos debido a la fortísima actividad de la región reguladora analizada en esta línea. Como referencia se tomaron los niveles observados en la línea PM4 ya que en esta línea, el fragmento que dirige la expresión del transgén contiene todos los elementos reguladores de la transcripción de la PM (con la excepción de los que regulan la expresión en IFM). Las líneas (-1.7/-1.4)PM muestran un patrón de tinción similar que el de PM4 pero los niveles detectados son más bajos. Las líneas (-2.3/-1.4) PM muestran también un patrón de expresión idéntico sin embargo, los niveles son mucho más altos. La incorporación de secuencias localizadas en posición 3' de la región MEF-E [líneas (-1.7/-1.15)PM y (-1.7/-0.75)PM] hace que disminuyan los niveles en todos los músculos. Los niveles de expresión más altos están representados por +++. El símbolo - representa ausencia de tinción.

1.2 Regulación de la transcripción de la Miniparamiosina

La Miniparamiosina (mPM), otro componente del filamento grueso de invertebrados, también está codificada por el gen PM/mPM. Esta proteína se expresa casi exclusivamente en la musculatura adulta, aunque también hay expresión en larvas de tercer estadio que desaparece inmediatamente al inicio de la pupación (Maroto *et al.*, 1996). La expresión de la mPM está regulada por un promotor localizado en el intrón 7 del gen, en posición 5' del inicio de la transcripción de su mRNA. En este intrón se han localizado, a parte del promotor basal, tres elementos o módulos altamente conservados también en *D. virilis*. Estos módulos se localizan en las posiciones -1342, -1127 y -477 y se denominaron AB (127pb), BF (34 pb) y TX (263 pb) respectivamente (Arredondo *et al.*, 2001a). Los primeros trabajos realizados en el laboratorio para identificar la función de estos módulos en la regulación de la expresión de la mPM parecían sugerir que estos módulos activaban la expresión en distintas partes del cuerpo de *Drosophila*. Así, el módulo AB parecía ser esencial para la expresión en los músculos hipodérmicos abdominales y los módulos BF y TX para la expresión torácica (Arredondo *et al.*, 2001a).

1.2.1 Análisis *in vivo* de la función de los módulos conservados AB, BF y TX.

Para analizar si los módulos conservados AB, BF y TX son activadores de la transcripción en músculos específicos, seguimos la misma estrategia utilizada en el estudio de la región MEF-E presente en el promotor que controla la expresión de la PM. El estudio se llevo a cabo por transgénesis. Para ello, se generaron líneas que expresan la β -galactosidasa bajo el control de cada uno de estos módulos por separado y por varias combinaciones de los mismos. Las líneas se denominaron en función del elemento o elementos que dirigen la expresión del transgén: AB, BF, TX, AB-BF, AB-TX y BF-TX. Una vez obtenidas las líneas en homocigosis se realizó un estudio comparativo de expresión de la β -galactosidasa en los músculos hipodérmicos larvarios (3^{er} estadio) y de adultos así como, en los músculos especializados del adulto (IFM y TDT). Los resultados obtenidos en una de las líneas representativas de cada construcción se muestran en las figuras 11, 12 y 13 y tabla 3. Como control se utilizó la línea mP1.7 (cedida amablemente

por el Dr. S. Bernstein) que contiene todo el intrón 7 del gen PM/mPM unido al promotor heterólogo *hsp70* dirigiendo la expresión del gen testigo (Arredondo *et al.*, 2001a). El intrón tiene los tres módulos, AB, BF y TX y el promotor basal que dirige la expresión de la mPM. El patrón de expresión del transgén en la línea mP1.7 se asemeja al de la mPM que se expresa fuertemente en los músculos de salto (TDT) y débilmente en los músculos de vuelo (IFM) (Maroto *et al.*, 1996). En esta línea se aprecia también actividad β -galactosidasa en los músculos abdominales y en los músculos de la cabeza de la larva de tercer estadio (Figura 11).

En los adultos de las líneas AB se observa una fortísima expresión del transgén en los músculos fibrilares indirectos de vuelo (IFM) (Figuras 11 y 12). Sin embargo, no se observa tinción en la musculatura tubular que incluye los músculos de salto (TDT), músculos directos de vuelo (DFM), músculos de las patas y los músculos abdominales. En el abdomen se observa una tinción inespecífica en los aenocitos (Figura 12). Los aenocitos son células de origen ectodérmico con función secretora. La inmunotinción con el anticuerpo de la mPM no revela la presencia de la proteína en esas células (datos no presentados). En las larvas, no se detecta actividad β -galactosidasa en los músculos hipodérmicos, aunque también se observa tinción inespecífica de los aenocitos (Figura 11).

En las líneas BF, sorprendentemente, no se detectó expresión del transgén en ningún tipo de músculo y en ninguna etapa del desarrollo (Figura 11).

Los adultos de las líneas TX muestran una actividad β -galactosidasa muy fuerte en los TDT, DFM, músculos de las patas y en la musculatura visceral. También, se puede observar una expresión muy débil en los IFM. En los músculos hipodérmicos abdominales, la expresión del transgén es baja (Figuras 11 y 12). El patrón de expresión de las líneas TX y el de las líneas AB en los músculos especializados de adultos es prácticamente complementario. En las larvas de las líneas TX se observa una fuerte expresión en la musculatura de la cabeza de la larva. En algunas larvas se tiñen más músculos, observándose una especie de gradiente de tinción que comienza muy fuerte en la parte anterior y va perdiendo intensidad a medida que nos acercamos a la parte posterior, donde se aprecian sólo algunos músculos teñidos débilmente. Aunque mucho más intenso, este patrón de expresión larvario es equivalente al de la línea control mP1.7 (Figura 11).

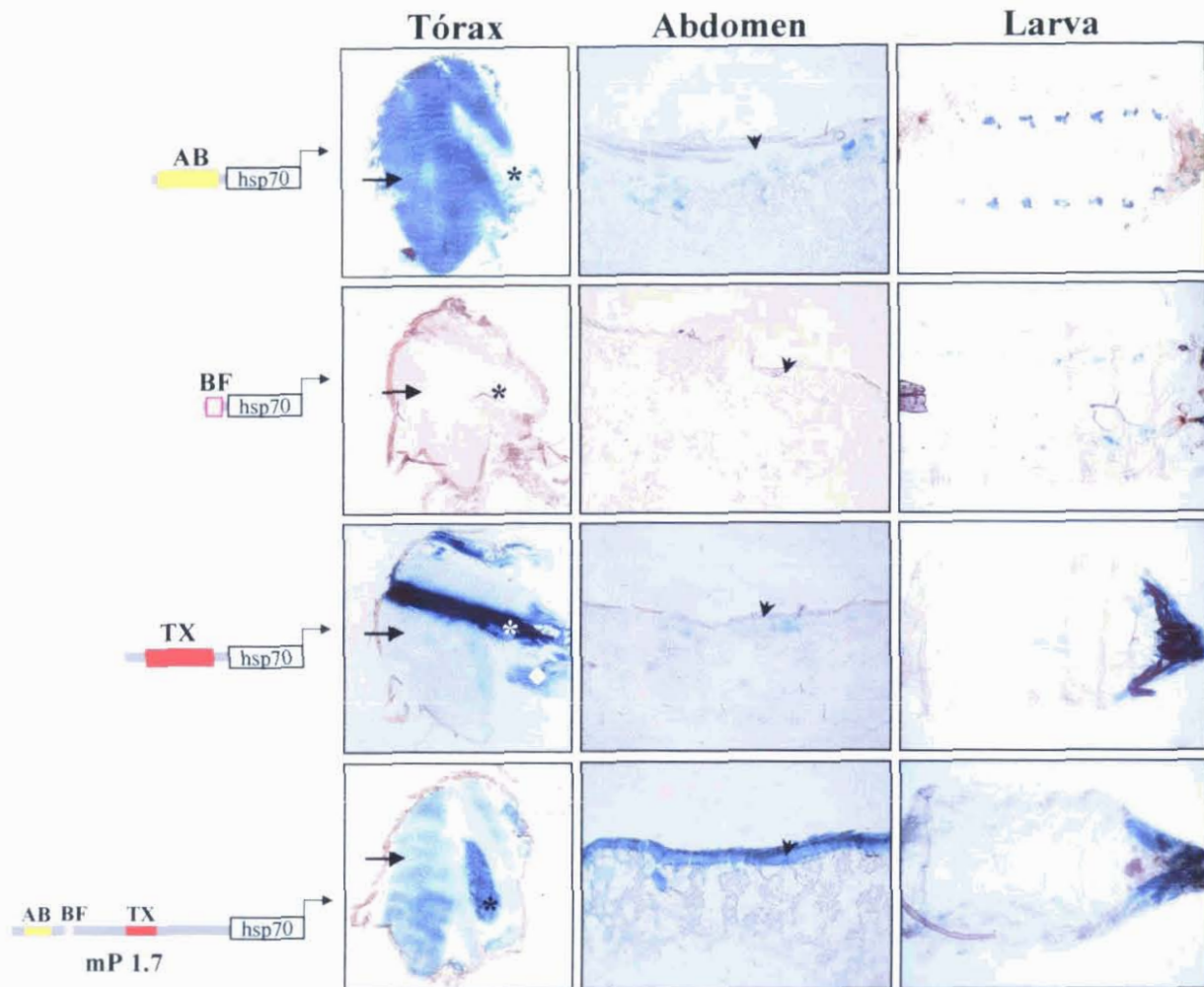


Figura 11. Papel de los módulos conservados AB, BF, TX en la regulación de la expresión de la Miniparamiosina. Detección de la actividad β -galactosidasa por tinción con X-gal en secciones de adultos (tórax y abdomen) y larvas de 3^{er} estadio disecadas, de las líneas AB, BF, TX y la línea mP1.7. Todas las muestras se tiñeron durante 1 hora. A la izquierda se muestra un esquema de los elementos reguladores que dirigen la expresión del transgén en cada tipo de línea. En las líneas AB se tiñen intensamente los IFM (\rightarrow). La tinción observada en las larvas de estas líneas es inespecífica. En las líneas BF no se observa expresión en ningún músculo. La falta de actividad en estas líneas se comprobó mediante tinción a tiempos más largos. En las líneas TX se detecta una tinción muy fuerte en los TDTs (*), en los músculos de las patas (\blacklozenge) de los adultos y en los músculos de la cabeza de las larvas. Los músculos abdominales(\blacktriangleright) y los IFM también se tiñen en las líneas TX aunque de forma muy débil.

Cuando la expresión del transgén está regulada por la combinación AB-TX, observamos expresión en todos los músculos del adulto (Figura 12). La presencia de los dos módulos, AB y TX, da como resultado un patrón y unos niveles de expresión similares a la suma de los observados con los dos módulos por separado, excepto en los músculos hipodérmicos abdominales donde la tinción es más fuerte y definida. En larvas la tinción es similar a la observada en las líneas TX. No obstante, los niveles de expresión obtenidos con estos dos módulos no reflejan los niveles de expresión de la mPM, que son más bajos. En resumen, la presencia de ambos módulos es responsable del patrón de expresión de la mPM pero no parece existir ningún efecto modulador de uno sobre el otro.

Un posible candidato para ejercer un efecto modulador de los niveles de expresión era el elemento conservado BF. Por ello, se generaron dos tipos diferentes de líneas transgénicas. Unas que expresan el gen testigo bajo el control de los módulos AB-BF y otras bajo el control de BF-TX (Figura 13). La posición de relativa de los módulos se mantuvo siempre igual a la del gen endógeno. El patrón de expresión de la β -galactosidasa en los adultos de las líneas AB-BF es similar al observado en las líneas AB, es decir, el transgén se expresa casi exclusivamente en IFM pero los niveles son mucho más bajos. Estos niveles son similares a los observados en la línea control mP1.7 y a los de la mPM en estos músculos. Estos resultados indican que BF modula la expresión en los IFM.

Las líneas BF-TX, al igual que las líneas TX, muestran actividad β -galactosidasa en los TDT, músculos de las patas, DFM, músculos hipodérmicos abdominales y los músculos de la cabeza de las larvas de 3^{er} estadio (Figura 13). La diferencia fundamental entre estas líneas y las líneas TX son los niveles de expresión del transgén en los músculos especializados del adulto. Así, se observa una desaparición total de la expresión en IFM y una bajada de la expresión en TDT. En los músculos anteriores de la larva no se aprecian diferencias. Sin embargo, el efecto modulador de BF sobre TX no es tan claro como el efecto sobre AB.

Por tanto, podemos decir que la transcripción de la mPM está regulada por al menos dos activadores, AB y TX, que consiguen que la proteína se exprese en los músculos donde se necesita, y un modulador de la transcripción que restringe los niveles de expresión alcanzados por AB y TX en los músculos especializados del adulto.

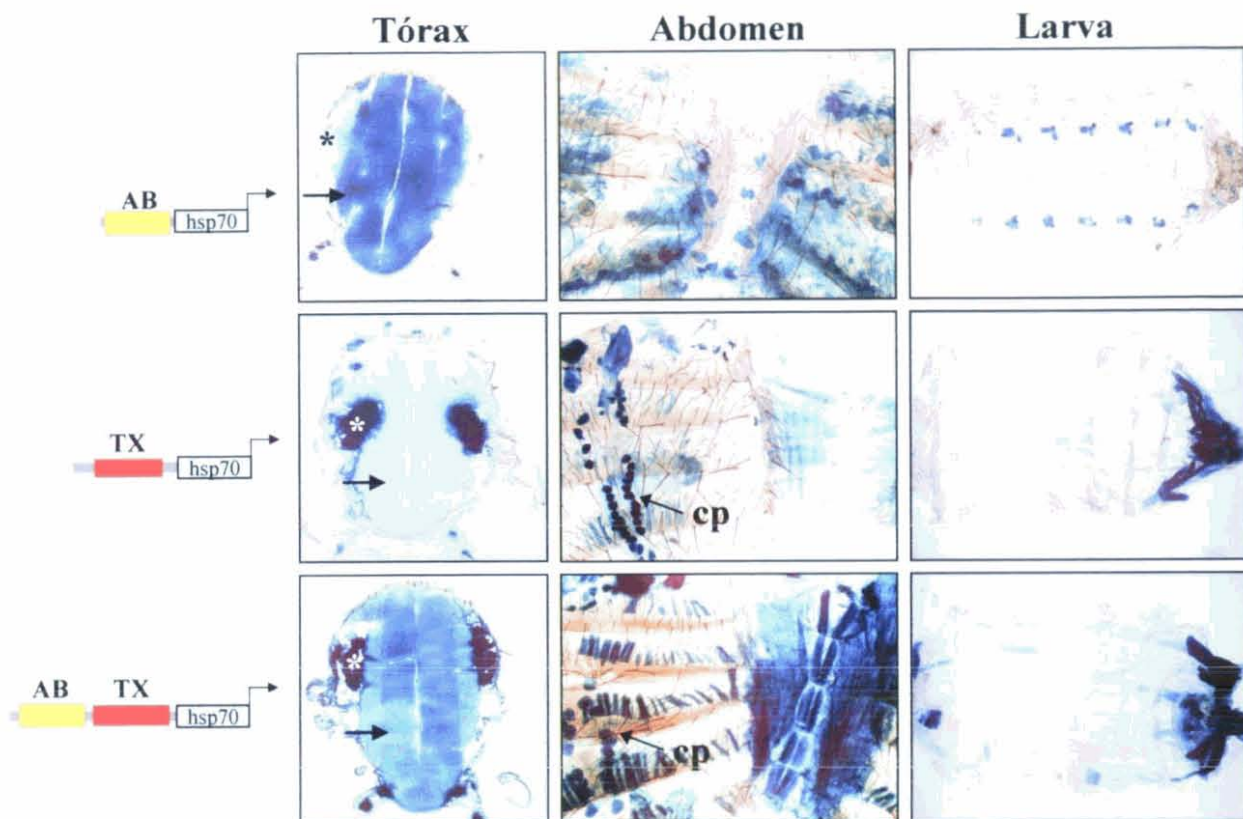


Figura 12. La presencia de los elementos AB y TX es necesaria para la expresión en todos los músculos del adulto. Tinción con X-gal de secciones de tórax y abdomen de adultos y de larvas de 3^{er} estadio disecadas, de las líneas AB, TX, y AB-TX. Todas las muestras se tiñeron durante 1 hora. A la izquierda se muestra un esquema de los elementos reguladores que dirigen la expresión de β -galactosidasa en cada tipo de línea. La línea AB-TX muestra una tinción con X-gal en los músculos torácicos y en los larvarios que es la suma de la tinción observada en las líneas AB y TX. La tinción observada en el abdomen y la larva de las líneas AB (aenocitos), así como la de las células pericárdicas (cp) en las líneas TX y AB-TX es inespecífica. En los músculos hipodérmicos abdominales la tinción observada en las líneas AB-TX es mucho más fuerte y regular que la obtenida con el módulo TX. * TDTs, \rightarrow IFM.

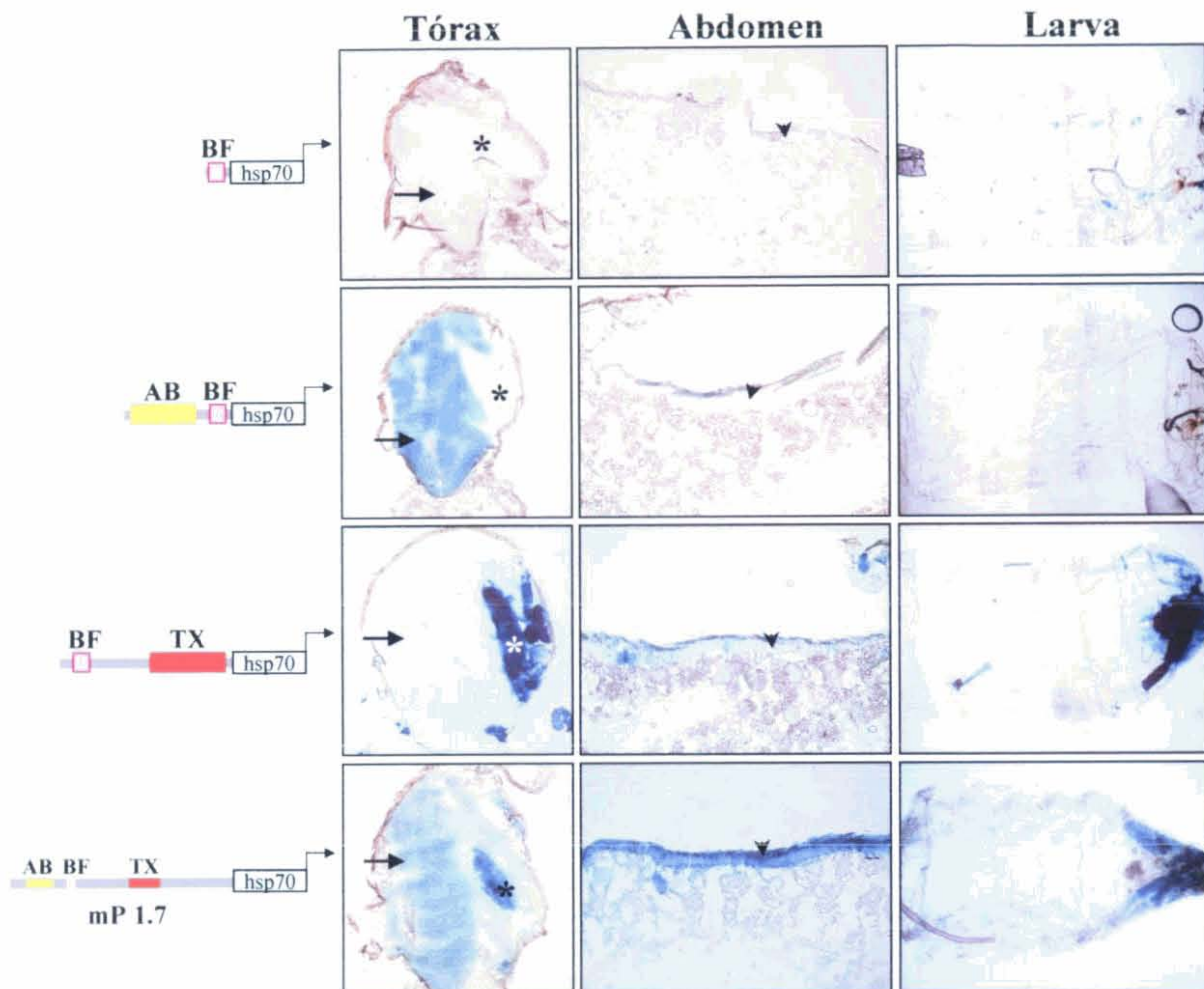
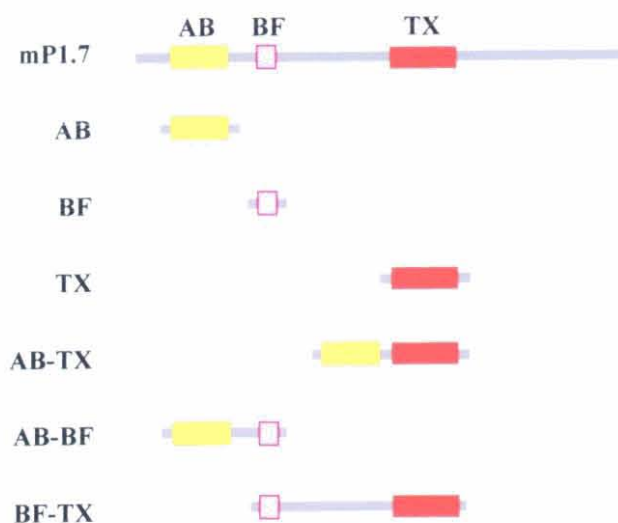


Figura 13. BF modula negativamente los niveles de expresión originados por los elementos AB y TX en los músculos de adultos. Tinción con X-gal de secciones de tórax y abdomen de adultos y de larvas de 3^{er} estadio disecadas, de las líneas BF, AB-BF, BF-TX, y mP1.7. Las muestras se incubaron en solución de tinción durante 1 hora. La combinación de AB-BF hace que se exprese el transgén únicamente en los IFM, igual que el módulo AB solo, pero los niveles son más bajos pareciéndose más a los niveles detectados en mP1.7. En el abdomen de estas líneas se observa tinción inespecífica en la cutícula. En las líneas BF-TX se observa una pequeña disminución en los niveles de expresión en TDTs con respecto a las TX, aunque la diferencia es menos apreciable que en el caso anterior. * TDTs, → IFM, ► músculos hipodérmicos abdominales.

A



B

Expresión de β -galactosidasa

	Nº Líneas analizadas	TDT	IFM	Músculos de las patas/DFM	Músculos abdominales	Músculos larvarios*
mP1.7	1	+++	+	++	++	+
AB	4	-	+++	-	-	-
BF	2	-	-	-	-	-
TX	2	++++	+/-	+++	+	+++
AB-TX	3	++++	+++	+++	++	+++
AB-BF	4	-	+	-	-	-
BF-TX	3	+++	-	+++	+	+++

Tabla 3. Comparación de los niveles de expresión de β -galactosidasa entre las diferentes líneas generadas para el estudio de la función de los módulos AB, BF y TX. A. Esquema de los elementos analizados en cada tipo de línea. B. Comparación de los niveles de expresión del transgén entre las diferentes líneas para un mismo tiempo de tinción. Se tomó como referencia los niveles observados en la línea mP 1.7 que contiene el intrón 7 del gen PM/mPM donde se localizan los tres módulos.

* Los niveles de expresión en los músculos larvarios son los observados en los músculos de la cabeza.

1.2.2 Búsqueda de factores que interaccionan con la región conservada BF.

La búsqueda de posibles sitios de unión para factores de transcripción miogénicos conocidos en los módulos AB, BF y TX, con distintos programas bioinformáticos (ver Materiales y Métodos) indicó que, con la excepción de una caja E no conservada en *D. virilis* en el módulo BF, no existían sitios consenso de unión para estos factores (Arredondo, 1999, Tesis doctoral). La mayoría de los factores de transcripción miogénicos descritos hasta el momento participan tanto en la formación del músculo larvario como en la del adulto. Este hecho nos hizo pensar que probablemente existieran otros factores no descritos, implicados en la regulación de la expresión de proteínas musculares específicas de adulto, como la Miniparamiosina. Todo esto nos llevó a plantearnos la búsqueda de factores que se unieran a estas secuencias por el método de *Un Híbrido* en levadura.

El estudio se comenzó con el módulo BF por dos razones que lo convertían en un interesante y manejable objeto de estudio: primero, la importante función moduladora de la transcripción de la mPM que parecía desempeñar y segundo, el pequeño tamaño del elemento (34pb).

Para llevar a cabo este estudio, quisimos ver en primer lugar, si esta región era capaz de unir factores de transcripción *in vitro*. Para ello realizamos ensayos de retardo en gel con un oligonucleótido con la secuencia de BF y extractos nucleares de embriones o de adultos de *Drosophila*. En estos ensayos se observaba siempre la formación de seis complejos de distinto peso molecular (Figura 14). En un intento de determinar qué secuencias de BF eran las responsables de la interacción se realizaron ensayos de retardo con una batería de oligonucleótidos en los que se introdujeron mutaciones seriadas de 6 en 6 nucleótidos analizando así todo el elemento. Tratábamos de averiguar de esta forma si al incluir estas mutaciones alguno o algunos de los complejos dejaba de unirse. Los resultados no fueron ni claros ni concluyentes (Datos no mostrados).

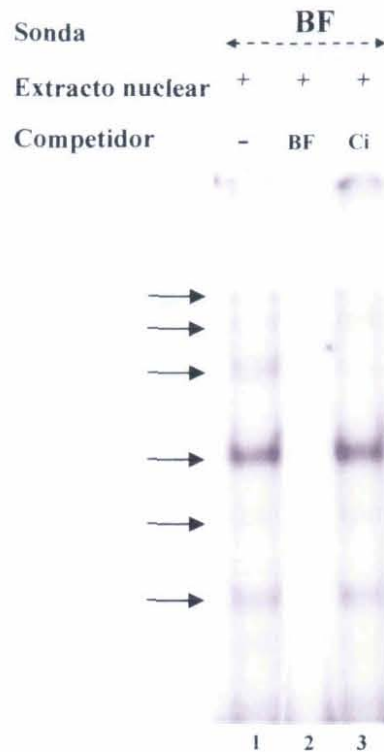


Figura 14. El elemento BF une varios complejos *in vitro*. Se analizó la capacidad de un oligonucleótido que contiene la secuencia BF, de unir proteína *in vitro* mediante ensayos de retardo en gel. El experimento se realizó con extractos nucleares de embriones (con extractos de adultos se obtuvo el mismo resultado). En todos los casos se observa la formación de 6 complejos de distinto peso molecular (carril 1). Esta unión es competida por un exceso del mismo oligonucleótido frío (carril 2) y no lo es por un exceso de un oligonucleótido inespecífico (Ci, carril 3).

Para realizar la búsqueda e identificación de factores por el método de *Un Híbrido* en levadura utilizamos como cebo 5 copias de BF unidas en tándem dirigiendo la expresión del gen de levadura HIS3 y una genoteca de cDNA de adultos de *D.melanogaster* fusionados al dominio de activación de GAL4 (Ver Materiales y Métodos). Como controles se utilizaron dos clones de levadura diferentes que portaban cinco copias de BF mutado. Uno de estos clones llevaba mutado los dos extremos del elemento BF (BFExtMut) y la otra las 24 pb centrales (BF4mt/6) (Figura 15A). La utilización de estos dos controles nos podría indicar también si el hipotético factor o factores que interaccionen con el elemento BF se unen a los extremos, a la porción central, o donde solapan las dos mutaciones.

Se rastrearon aproximadamente 8×10^6 clones de los que unos 273 permitieron el crecimiento en medio selectivo de la levadura transformada con el cebo. Estos clones se analizaron por digestión con enzimas de restricción (ver Materiales y Métodos). Los cDNAs de tamaños más repetidos fueron secuenciados. El análisis de las secuencias mediante BLAST contra el genoma de *Drosophila melanogaster* reveló que el 60% de los cDNAs aislados correspondían a diferentes isoformas del factor de transcripción PDP1. Los clones correspondientes a PDP1 no permitían el crecimiento de ninguna de las dos cepas de levadura control, mientras que el resto de los clones permitía crecer a las dos. Este resultado indicaba que los clones que contenían el cDNA de PDP1 eran verdaderos positivos y que además, el sitio de interacción de este factor está localizado en una de las regiones de BF donde solapan las dos mutaciones utilizadas como control. Al revisar la secuencia de BF observamos en el extremo 5', la secuencia AAAATTG que en la cadena complementaria es TTTTAAC. Esta secuencia es parecida a la secuencia consenso descrita para la unión de PDP1: ATTTTGTAAC (Lin *et al.*, 1997b). La parte más 5' de esta secuencia está mutada en BFExtMut y la 3' lo está en BF4mt/6 lo que explica que no crecieran ninguna de las levaduras control al ser transformadas con el cDNA de PDP1 (Figura 15A).

El factor de transcripción PDP1 es el único miembro descrito en *Drosophila* de la subfamilia PAR de factores con cremalleras de leucina. El gen *Pdp1* es bastante complejo. Tiene 4 sitios de inicio de la transcripción y codifica al menos 6 isoformas que tienen una expresión diferencial en distintos tejidos del embrión de *Drosophila* (Reddy *et al.*, 2000) donde van a participar en su diferenciación. Las isoformas α , β y δ se expresan en los

precursores de los músculos somáticos, en los músculos somáticos, en los músculos faríngeos y en el intestino medio. Trabajos realizados en el estudio de la regulación de la transcripción del gen *Tm 2* demostraron que PDP1 es esencial para la expresión de este gen (Lin *et al.*, 1997b). Se han identificado sitios de unión para PDP1 en las regiones reguladoras de la expresión de otras proteínas musculares como por ejemplo la TnT, o la Paramiosina (Arredondo *et al.*, 2001a; Mas *et al.*, 2004) lo que indica que este factor juega un papel importante en la diferenciación terminal del músculo.

El análisis de los clones de PDP1 obtenidos, reveló que la mayoría de los cDNAs aislados en el rastreo correspondían a las isoformas α , β y δ . Otra parte de los cDNAs contenían únicamente la porción común a todas las isoformas que corresponde a los últimos 4 exones del gen y por tanto no podíamos identificar de qué isoforma se trataba.

La unión de PDP1 al elemento BF se confirmó por ensayos de retardo en gel con la proteína transcrita y traducida *in vitro* (Figura 15B carril 2). En los ensayos de competición con el oligonucleótido BFExtMut se observa que la mutación introducida en este oligonucleótido disminuye fuertemente la capacidad de unir PDP1 (Figura 15B, carriles 5 y 6). Al añadir un anticuerpo anti-PDP1 se observa una banda de sobrerretardo (carriles 7, 8 y 9).

1.2.3 PDP1 activa la expresión de *LacZ* en los músculos de la cabeza en las larvas de las líneas BF-TX.

Para analizar si PDP1 interviene en la regulación de la transcripción de la mPM, decidimos observar la expresión del transgén *LacZ* dirigida por los módulos BF-TX en un fondo mutante para PDP1. No elegimos las líneas BF ya que no muestran expresión del transgén en ningún tejido. Para ello, cruzamos las líneas, BF-TX con la línea mutante *w;Pdp1^{P205}/TM6C,Sb,Tb*. Esta línea tiene una delección del locus *Pdp1*. Los individuos homocigotos para la mutación muestran un retraso importante en el desarrollo con respecto a los heterocigotos. Los homocigotos alcanzan el tercer estadio larvario a los 14-21 días después de su puesta, cuando los heterocigotos ya son adultos. Este retraso es debido a que una de las isoformas de PDP1, PDP1 ϵ , tiene un papel fundamental en el funcionamiento del reloj circadiano de *Drosophila* (Cyran *et al.*, 2003). Algunos homocigotos llegan a pupar

A

	PDP1
BF	AGAAAATTGCGCAGTTGCTGTGATTACACAAT
BFExtmt	AGTCTATTGCGCAGTTGCTGTGATTACACGTC
BF4/6mt	AGAAATCGATTACGTGAGATGCTGATACGAAT

B

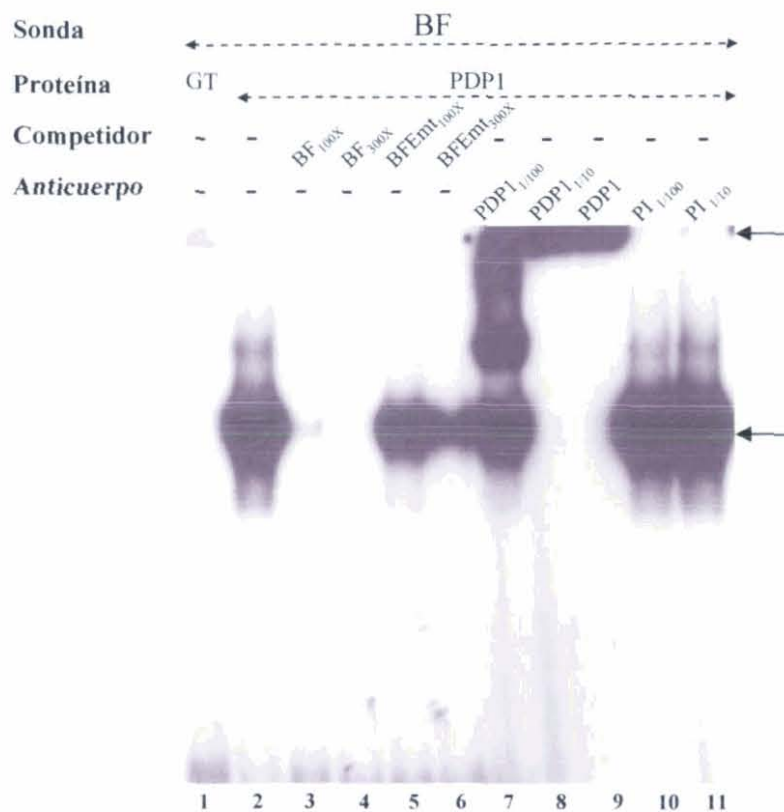


Figura 15. El factor de transcripción PDP1 interacciona con el elemento BF. **A.** Secuencia del elemento BF y de los elementos mutados BFExtmt y BF4/6mt utilizados como controles en el rastreo por el método de “un híbrido”. Se destaca en verde la secuencia parecida al consenso descrito para la unión de PDP1 y en rojo las mutaciones introducidas en los controles BFExtmt y BF4/6mt. **B.** Ensayos de retardo en gel con PDP1 transcrito y traducido *in vitro*. En el carril 1 se añadió como control el extracto de germen de trigo (GT) utilizado para producir PDP1. La unión de PDP1 al oligonucleótido BF es desplazada completamente por un exceso del mismo oligonucleótido no radiactivo (carriles 3 y 4) mientras que no lo es por un exceso del oligonucleótido BFExtmt (carriles 5 y 6). En los carriles 7, 8 y 9 se añadieron distintas cantidades de un anticuerpo anti-PDP1, produciéndose sobrerretardo en todos los casos. En los carriles 10 y 11 se añadió como control distintas concentraciones de un suero preinmune (PI).

aunque una proporción muy pequeña eclosiona y los adultos mueren en un día. Esto hace prácticamente imposible el análisis de la expresión del transgén en individuos adultos. Por este motivo tampoco hemos analizado el efecto en las líneas AB-BF ya que sólo expresan *LacZ* en el estadio adulto.

El análisis de la expresión de β -galactosidasa en las larvas de tercer estadio con la construcción BF-TX y homocigóticas para la mutación en *Pdp1*, muestra una drástica disminución de la expresión en los músculos de la cabeza, llegando a desaparecer por completo en algunos músculos (Figura 16). Como control se utilizaron larvas heterocigóticas que muestran una expresión similar a la observada en las líneas BF-TX sin mutación. El experimento se realizó con dos líneas diferentes de BF-TX obteniéndose el mismo resultado. Este resultado indica que PDP1 juega un papel fundamental en la activación de la expresión de la mPM en los músculos larvarios de la cabeza.

El hecho de que las líneas TX muestren una expresión en larvas similar a la observada en las líneas BF-TX, es decir, que no se observe un aumento de la expresión larvaria al añadir el módulo BF que contiene un sitio de unión para PDP1, nos hizo pensar que el efecto observado en los mutantes podría no ser exclusivamente por la falta de interacción de este factor con el módulo BF. Entonces decidimos buscar si existían otros posibles sitios de unión para PDP1 en el fragmento clonado en las líneas BF-TX. Encontramos un sitio de unión localizado en posición 5' del inicio del módulo TX que está incluido también en las líneas TX. La secuencia de este sitio es igual a la encontrada en el módulo BF. Podría ser que este sitio estuviera desempeñando un papel fundamental en la activación de la expresión en los músculos de la cabeza de las larvas a pesar de que este sitio no está conservado en otras especies de *Drosophila*. Otra posible explicación podría ser que al no interaccionar PDP1 con la secuencia presente en el módulo BF se permitiera el acceso a este elemento de complejos represores que inhibieran la expresión del transgén.

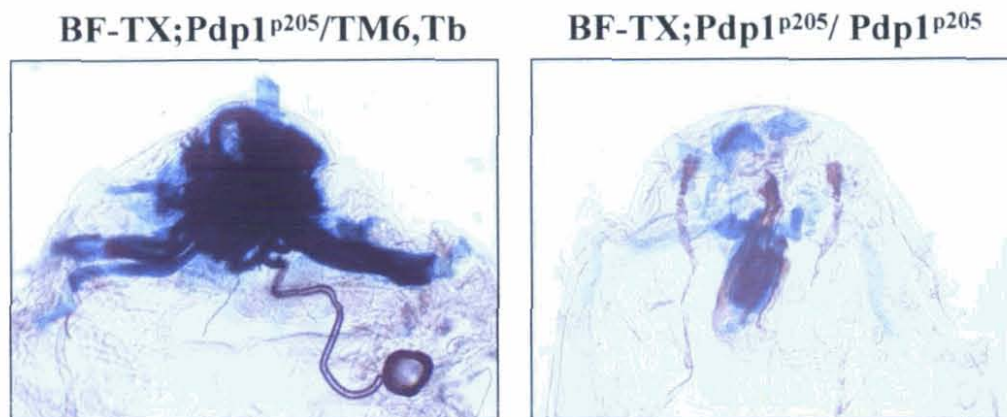


Figura 16. PDP1 participa en la expresión de β -galactosidasa en los músculos larvarios de la cabeza en las líneas BF-TX. Detección de actividad β -galactosidasa por tinción con X-gal, en larvas de 3^{er} estadio disecadas de las líneas BF-TX homocigóticas para la mutación PDP1^{p205} o heterocigóticas (PDP1^{p205}/TM6,Tb). Se observa una reducción importante de la tinción en los músculos de la cabeza de las larvas homocigóticas para la mutación. La tinción observada en las líneas heterocigóticas es similar a la observada en las líneas sin mutación.

2. SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T EN LOS MÚSCULOS INDIRECTOS DE VUELO DE *Drosophila*

Una de las formas de estudiar la función de una proteína, consiste en analizar las consecuencias de su sobreexpresión. El estudio de la función de la Troponina T (TnT), uno de los componentes del complejo Troponina del filamento fino, se realizó utilizando esta estrategia. Se estudió el efecto producido por un aumento de los niveles de esta proteína en los músculos indirectos de vuelo (IFM) de *Drosophila*. Estos músculos altamente especializados son un sistema ideal para el estudio de la función de los componentes del sarcómero, ya que son dispensables para la viabilidad de insecto. Alteraciones en la estructura y función de los IFM simplemente afectan a la capacidad de vuelo de la mosca. Además, estos músculos poseen una estructura muy regular facilitando la detección de pequeños cambios estructurales.

La estrategia que se ha utilizado para sobreexpresar la TnT en *Drosophila* ha sido emplear un promotor fuerte que dirija la expresión de esta proteína a los músculos indirectos de vuelo. El promotor que hemos utilizado ha sido el del gen de la Actina 88F, una isoforma de la Actina que se expresa casi exclusivamente en los IFM (Fernandes *et al.*, 1991; Fyrberg *et al.*, 1983; Nongthomba *et al.*, 2001). Este promotor se ha utilizado con éxito para expresar en IFM otras proteínas musculares, como la Miniparamiosina, la cadena pesada de la miosina, o la Actina β -citoplasmática humana (Arredondo *et al.*, 2001b; Brault *et al.*, 1999; Cripps *et al.*, 1994), y los genes marcadores *LacZ* y GFP (Fernandes *et al.*, 1991; Nongthomba *et al.*, 2001). Se hizo una construcción en la que se fusionó una kilobase del promotor del gen *actina* 88F más la región 5' no traducida con el cDNA de la isoforma de la TnT específica de músculos torácicos (IFM y TDT) (Benoist *et al.*, 1998). Esta isoforma carece de los exones 3, 4 y 5 del gen. Con esta construcción, denominada P[w+, Act88F-TnT] (ver Materiales y Métodos y Figura 17), se generaron líneas transgénicas usando la técnica de transformación mediada por elementos P (Spradling & Rubin, 1982). Se obtuvieron 6 líneas que se denominaron OTnT (Overexpressing TnT) (Ver tabla 4). En todas estas líneas se determinó el cromosoma en el que se había insertado la construcción y se estabilizaron en homocigosis.

<i>Líneas con la construcción</i> <i>P[w+, Act88F-TnT]</i>	<i>Localización cromosómica de la inserción</i>
OTnT5	2
OTnT19	2
OTnT30	3
OTnT32	2
OTnT37	2
OTnT48	3

Tabla 4. Líneas obtenidas con la construcción P[w+, Act88F-TnT].



Figura 17. Esquema de la construcción generada para la obtención de las líneas transgénicas OTnT. El cDNA de la isoforma de la TnT de IFM (verde) se fusionó al promotor y la región 5' no traducida del gen de la actina 88F (negro). A continuación del cDNA de la TnT, se localiza la señal de poliadenilación de SV40 (gris). La construcción se realizó en un vector derivado de un elemento P (pCaSpeR 4) que conserva los extremos 5'P y 3'P para poder integrarse en el genoma de *Drosophila*. Este vector lleva además, el gen *white* que permite seleccionar las moscas transgénicas por el color rojo de los ojos.

2.1 Análisis de los niveles de sobreexpresión de la TnT en las líneas OTnT.

En la transcripción del gen de la TnT de *Drosophila* se generan por procesamiento alternativo cinco isoformas de diferente tamaño que son específicas de tipo muscular. Los exones 3, 4, y 5 están ausentes en el mRNA específico de IFM y TDT (Benoist *et al.*, 1998).

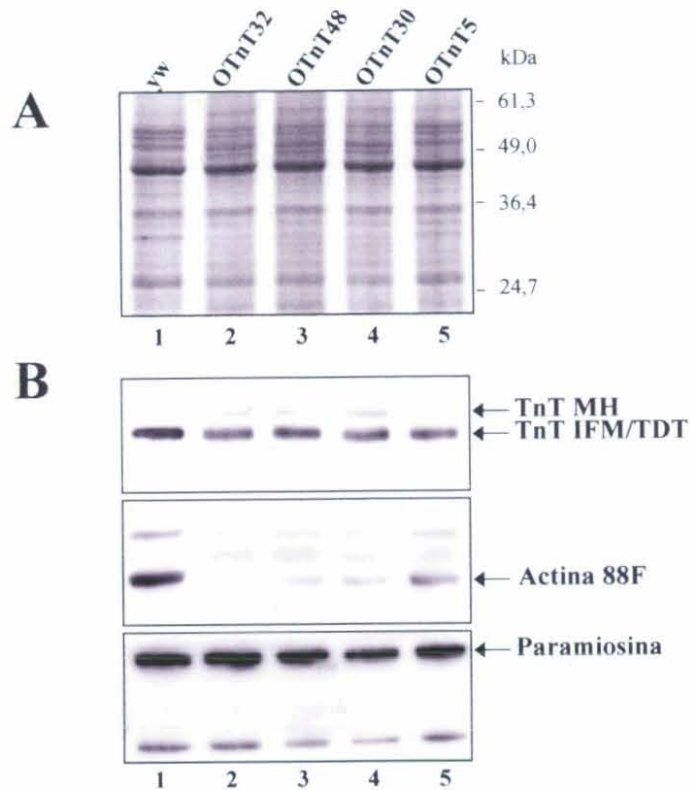


Figura 18. Expresión de TnT en las líneas transgénicas OTnT. **A.** Tinción con azul de Coomasie del gel de poliacrilamida-SDS con los homogenizados de moscas de un día de las líneas OTnT y del control *yw*. **B.** Análisis de la expresión de TnT, Actina 88F y Paramiosina por *Western-blot*. Las dos bandas reconocidas por el anticuerpo anti-TnT corresponden a las isoformas de músculos hipodérmicos (TnT MH) y a la de TDT e IFM (TnT IFM/TDT). Los niveles de TnT de IFM y los de Actina 88F de todas las líneas OTnT están reducidos con respecto al control *yw*. Sin embargo, los niveles de Paramiosina son normales.

Para confirmar si existía sobreexpresión de TnT en las líneas transgénicas OTnT se realizaron ensayos de *Western blot* con extractos de pupas tardías (96 horas después de la formación del pupario) o adultos de 24 horas y un anticuerpo que reconoce todas las isoformas de la TnT de *Drosophila* (Benoist *et al.*, 1998; Domingo *et al.*, 1998). Un aumento de la proteína en las líneas transgénicas debería corresponder a la sobreexpresión de la misma en los IFM. Los niveles de proteína se normalizaron con respecto a la cantidad total observada en el gel teñido con azul de Coomassie. Sorprendentemente, los niveles de la TnT específica de tórax (IFM y TDT), que corresponden a la isoforma de menor tamaño, en los estadios analizados eran menores en todas las líneas OTnT que los observados en las líneas control *yw* (Figura 18). El experimento se repitió varias veces obteniéndose siempre el mismo resultado tanto con pupas tardías como en adultos. Para analizar si en estas líneas los niveles de otras proteínas musculares también decrecían, se incubó la membrana con un anticuerpo específico contra la Actina 88F (cedido amablemente por el Dr. J. Sparrow) y también se observó una gran disminución de la cantidad de esta proteína en estas líneas con respecto a la línea control. Sin embargo, los niveles de Paramiosina, un componente del filamento grueso, en todas las líneas transgénicas, eran similares al de las líneas control. Estos resultados sugerían que, no sólo no había sobreexpresión de la TnT en la etapa analizada sino que, había una disminución de la proteína endógena que parecía afectar también a otros componentes del filamento fino pero no a componentes del filamento grueso.

Para entender el efecto observado y ver si la sobreexpresión se estaba produciendo, decidimos examinar los niveles de TnT en etapas de la pupación anteriores a las analizadas. La expresión del gen testigo *LacZ* dirigida por el promotor del gen *actina* 88F comienza a detectarse a 14h a partir de la formación del pupario (Fernandes *et al.*, 1991; Nongthomba *et al.*, 2001). Dado que la expresión de la TnT trasgénica está dirigida por el mismo promotor, decidimos analizar los niveles de esta proteína, mediante ensayos de *Western blot*, en pupas recogidas a las 14 y 16 horas a partir de la formación del pupario. En la figura 19 se presentan los resultados de dos líneas representativas: OTnT30 y OTnT32. En estos dos tiempos de la pupación, efectivamente, se observa un aumento de los

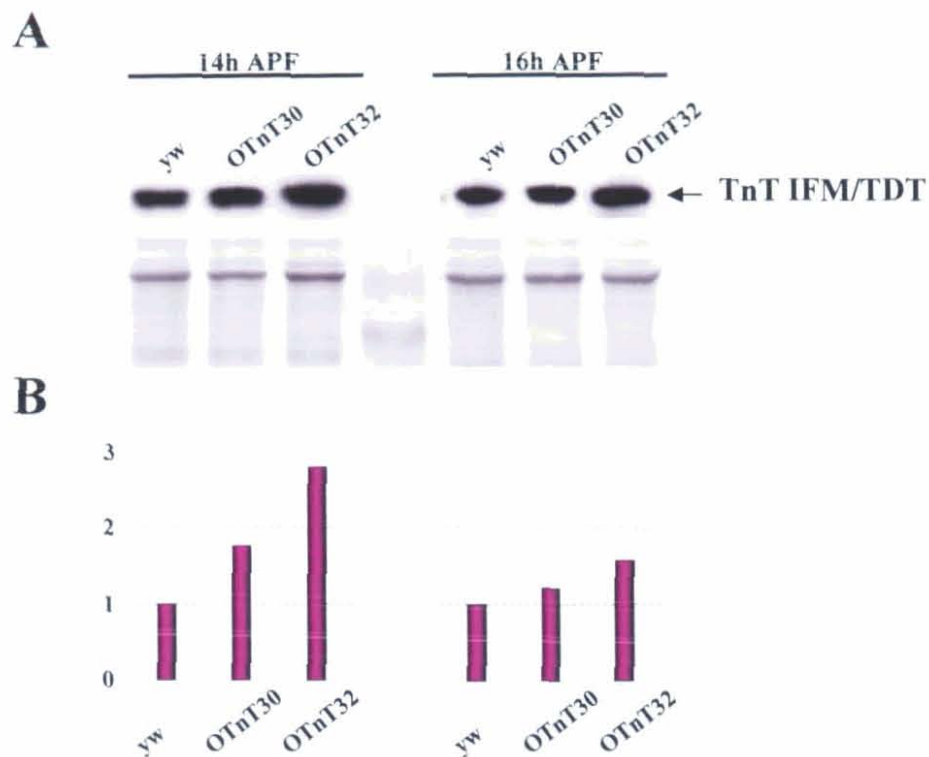


Figura 19. Expresión de la TnT a las 14 y 16 horas APF. **A.** Análisis de la expresión de la TnT en el control *yw*, y en las líneas *OTnT30* y *OTnT32* mediante *Western-blot* realizados con extractos de pupas recogidas a las 14 y 16 h a partir de la formación del pupario (APF), parte superior de la imagen. En la parte inferior de muestra el gel teñido con azul de Coomassie, utilizado como control de carga. **B.** Índice de expresión relativa de TnT. Se cuantificaron por densitometría las bandas observadas en los *Western-blots*. En todos los casos se corrigieron posibles diferencias en la cantidad de proteína total al normalizar frente a los controles de carga correspondientes. Los índices de expresión relativa se calcularon al dividir los valores obtenidos para cada una de las muestras, frente los obtenidos para el control *yw*. A las 14 horas APF, los niveles de expresión de TnT en las líneas *OTnT30* y *OTnT32* son respectivamente 1,8 y 2,8 veces superiores al control (gráfica de la izquierda). A las 16 horas APF (gráfica de la derecha) los niveles de TnT son 1,2 y 1,6 veces superiores al control.

niveles de la isoforma torácica de la TnT con respecto a las líneas control *yw*. Este aumento es más apreciable a las 14 horas. Aunque varía ligeramente de unas líneas a otras, se observa siempre un incremento aproximado de la cantidad de TnT de 2 veces con respecto a las líneas control. El incremento observado a las 16 horas es menor, aunque los niveles siguen siendo superiores al control, siendo este aumento de aproximadamente 1.25/1.5 veces (Figura 19).

Todos estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la TnT en etapas muy tempranas de la formación de los IFM produce una posterior disminución de los niveles de esta proteína y al menos también de la Actina 88F.

2.2 Niveles de mRNA de componentes del filamento fino.

Los resultados obtenidos indicaban que, tras un incremento inicial de la cantidad de TnT en los IFM, se producía a continuación una degradación o disminución de la TnT y de la Actina 88F. Para profundizar en este efecto y analizar si estas disminuciones eran debidas a un efecto de reducción de su síntesis o a una degradación se llevó a cabo, en primer lugar, el estudio comparativo de los niveles de mRNA de varios componentes del filamento fino y de un componente del filamento grueso. Se analizaron mediante ensayos de *Northern blot*, con mRNA de pupas tardías de todas las líneas, los mRNA correspondientes a la TnT transgénica, la TnT endógena, la Actina 88F, la TnI, la Tm 2 y la Paramiosina.

La sonda de la TnT que se ha utilizado hibrida con los mRNAs de todas las isoformas endógenas y también con la transgénica, ya que no es posible hacer una sonda que reconozca exclusivamente el mRNA de la isoforma torácica puesto que no tiene exones diferenciales sino que carece de exones que poseen las otras isoformas (Materiales y Métodos). Los niveles de mRNAs de la TnT endógena en todas las líneas son mucho más bajos que los del control *yw* (Figura 20). Las variaciones observadas entre las líneas son mínimas. Este resultado sugiere que la reducción de los niveles de TnT se debe, o por lo menos en parte, a una reducción de su síntesis. Una exposición más larga del *Northern blot* permite observar la banda correspondiente al transcrito de la TnT transgénica en todas las líneas OTnT. Este transcrito tiene un tamaño mayor que los de TnT endógena ya que tiene

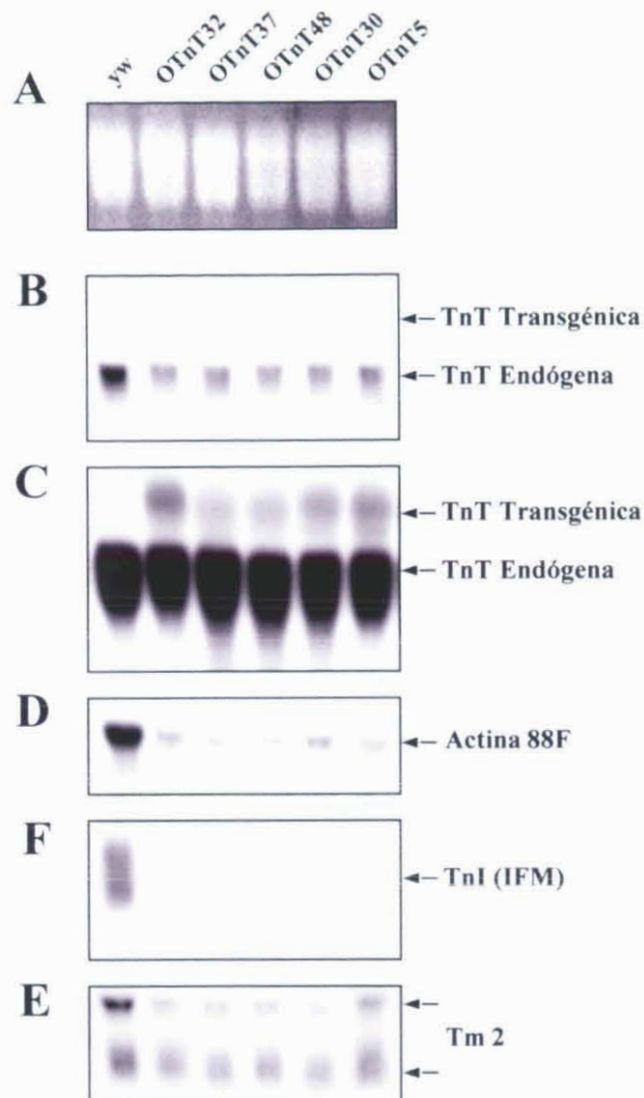


Figura 20. Análisis por *Northern-blot* de los niveles de mRNAs de los componentes del filamento fino en las líneas OTnT. RNA total procedente de pupas tardías se hibridó con sondas que reconocen los mensajeros de la TnT (**B** y **C**) de la Actina 88F (**D**), de la TnI (**F**) y de la Tm (**E**). En el panel **A** se muestra como control de carga los RNA ribosómicos teñidos con bromuro de etidio. Una exposición más larga de la membrana hibridada con la sonda de la TnT (**B**) revela la presencia del mRNA de la TnT transgénica en todas las líneas, excepto en el control *yw* (**C**).

la región 5' no traducida del gen de la *actina* 88F que es más larga que la del gen de la TnT. Los niveles de mRNA de la TnT transgénica con respecto a los de la endógena son muchísimo más bajos.

El estudio de los niveles de mRNA de otros componentes del filamento fino indicó que los niveles de mRNA de la Actina 88F también están fuertemente disminuidos en todas las líneas OTnT. Del mismo modo, también se observó una disminución de la isoforma de IFM de la Troponina I (TnI), la Tropomiosina 2 (Tm2). (Figura 20). En cambio, los niveles de mRNA de la Paramiosina, constituyente del filamento grueso son normales (Datos no mostrados).

Los resultados indican que, en todas las líneas OTnT, la síntesis de los componentes del filamento fino está disminuida mientras que la síntesis de los componentes del filamento grueso parece no estar afectada.

2.3 Análisis de la capacidad de vuelo de las líneas OTnT.

El estudio de funcionalidad muscular de las líneas OTnT se llevó a cabo mediante la realización de tests de vuelo que tenían como finalidad analizar la capacidad de volar de estas moscas transgénicas. Los tests se realizaron según se describe en Materiales y Métodos y, en ellos, se contabilizaba el número de moscas de cada línea que volaba, planeaba o caía desde una cierta altura. Se analizaron aproximadamente 100 moscas de un día de edad de 5 de las líneas OTnT (Figura 21). El 100% de las moscas de estas líneas son incapaces de volar frente a un 15-20% de las moscas *yw* con esta edad. Este resultado demuestra una clara disfunción de los músculos de vuelo (IFM) de estas moscas que las hace incapaces de volar. El resto de los músculos tanto somáticos como viscerales funcionan normalmente ya que las moscas son perfectamente viables y capaces de reproducirse.

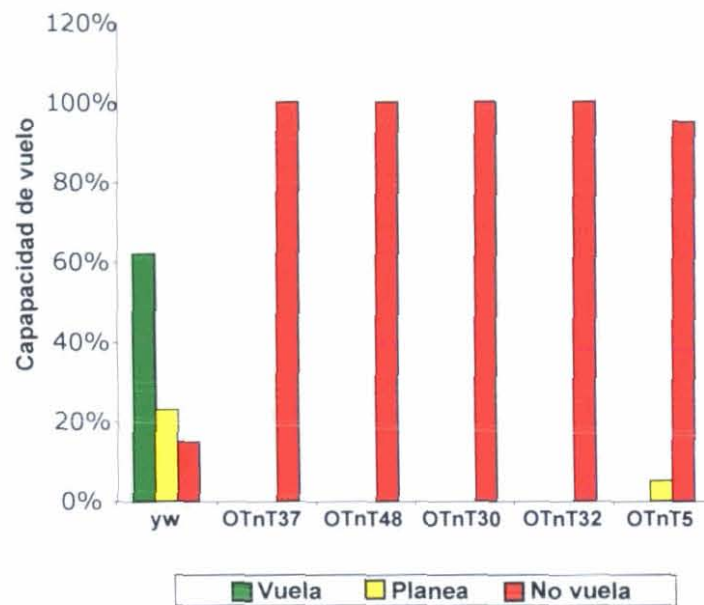


Figura 21. Las moscas de las líneas OTnT no vuelan. Se realizaron tests de vuelo para analizar la capacidad de volar de las moscas OTnT. Para ello se las dejó caer desde una altura de unos 25 cm en el interior de una caja transparente con una fuente de luz en la parte superior. Se observó si las moscas volaban hacia la fuente de luz, si planeaban antes de caer o si caían directamente. Se analizaron unas 100 moscas de 24h de edad por línea, incluyendo el control yw. Prácticamente el 100% de las líneas OTnT son incapaces de volar frente a un 15-20% de las moscas yw con esa edad.

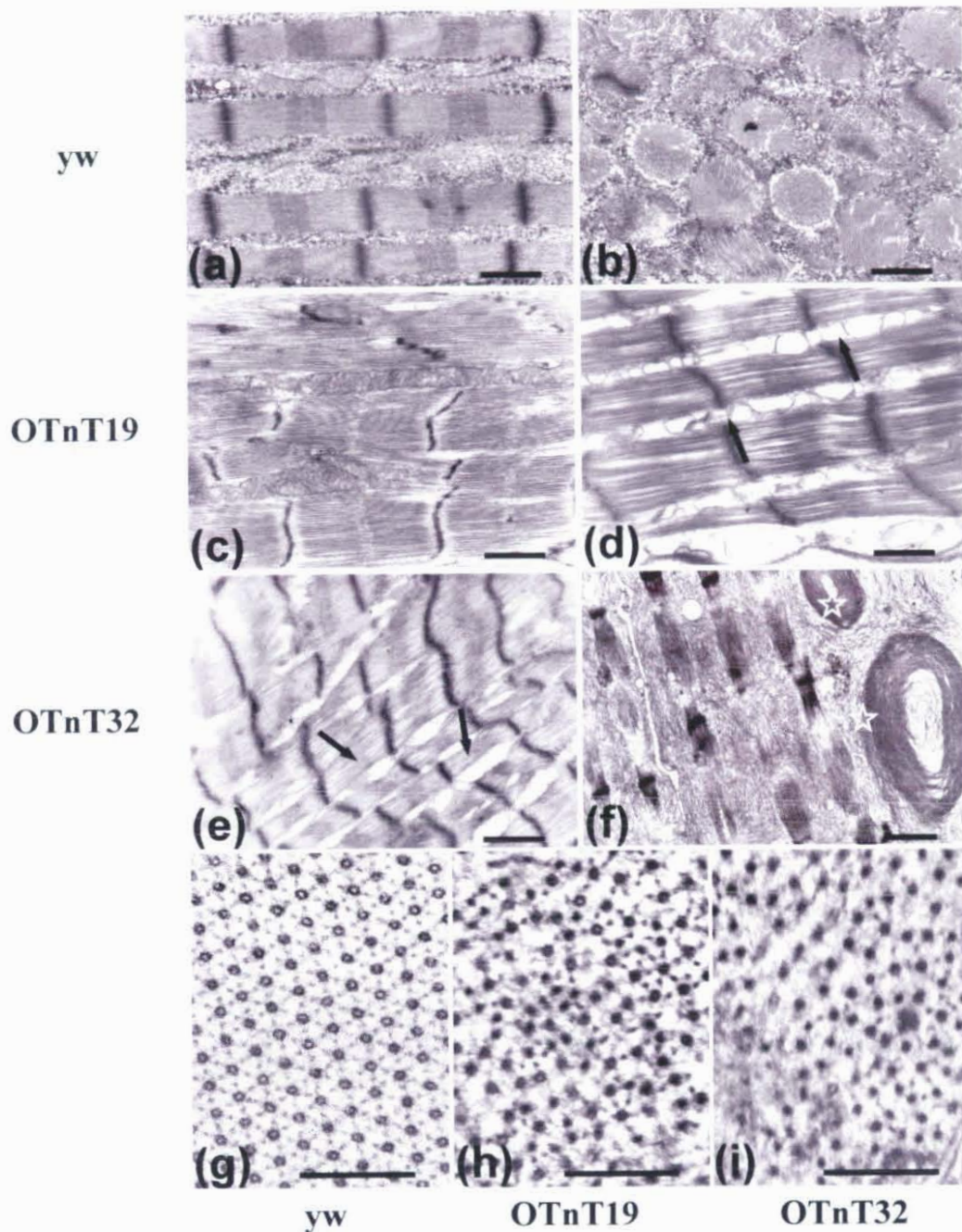


Figura 22. La estructura de los IFM en las líneas OTnT está fuertemente alterada. Micrografía electrónica de los IFM de moscas recién emergidas del control *yw* y las líneas OTnT19 y OTnT32. (a) y (b) Sección longitudinal y transversal de los IFM del control *yw*. (c) y (d) Secciones longitudinales de los IFM de moscas recién emergidas de la línea OTnT19. Las flechas señalan cisternas del retículo sarcoplásmico. (e) y (f) Secciones longitudinales de los IFM de moscas recién emergidas de la línea OTnT32. Las estrellas señalan unas estructuras circulares de material electrodensito de origen desconocido. (g), (h) y (i) Secciones transversales de IFM del control *yw* y las líneas OTnT19 y OTnT32 respectivamente. Barra = 2 μm (a-f) o 0.25 μm (g-i).

2.4 Estructura de los IFM de las líneas OTnT.

El estudio de la estructura de los músculos de vuelo se realizó por microscopía electrónica. La estructura de estos músculos se analizó en pupas tardías y adultos recién emergidos de cinco líneas OTnT representativas, y se compararon con pupas o moscas de las mismas etapas de líneas control *yw* para determinar si los defectos funcionales de estos músculos reflejan alteraciones estructurales. Además, el estudio se realizó en pupas tardías y en moscas de un día para discernir si los defectos que se observaran se debían a un problema de ensamblaje del sarcómero o a degeneración dependiente del tiempo o del uso como sucedía en otros casos (Arredondo *et al.*, 2001b; Wells *et al.*, 1996). La ultraestructura de los IFM en pupas tardías y moscas de la cepa salvaje es muy regular. En secciones transversales se observan las miofibrillas circulares con un diámetro regular. En secciones longitudinales se aprecian en las miofibrillas adyacentes, las unidades sarcoméricas alineadas en paralelo (Figura 22 a). Los filamentos gruesos y finos de los sarcómeros presentan una organización hexagonal que se aprecia claramente en secciones transversales (Figura 22 b y g). En los músculos de vuelo de las moscas transgénicas se observa una fuerte desorganización de su ultraestructura. El diámetro de las miofibrillas es muy variable en las líneas OTnT. En secciones transversales no se observa la estructura de red hexagonal regular típica de estos músculos (Figura 22 h, i). Se observa sin embargo, una desaparición de filamentos finos y una disposición desordenada de los filamentos gruesos. En sección longitudinal, los sarcómeros pertenecientes a miofibrillas adyacentes no presentan una disposición paralela como ocurre en las moscas control (Figura 22 c, d, e y f). Los discos Z en muchos casos están incompletos o no están formados. Lo mismo ocurre con las líneas M. Muchas veces no se observa una alternancia de bandas claras (I) y oscuras (A). En muchos casos se aprecia un aumento de cisternas del retículo sarcoplásmico entre las miofibrillas y a veces aparecen unas estructuras electrodensas de origen desconocido (Figura 22 f, estrella). Estas alteraciones se han observado tanto en adultos como en pupas tardías de las líneas OTnT, lo que indica que son debidas a un ensamblaje anormal de los IFM y no al deterioro debido a una puesta en funcionamiento de estos músculos. Este ensamblaje anormal seguramente es debido a la reducción de los filamentos finos en estas líneas.

Todos estos resultados sugieren que, un aumento de los niveles de TnT en los IFM durante la formación de los mismos, produce una consecutiva disminución de los niveles de todos los componentes del filamento fino, incluyendo la propia TnT. Esto conlleva una reducción de filamentos finos impidiendo el correcto ensamblaje de los sarcómeros y generándose un músculo no funcional.

DISCUSIÓN

1. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN PM/mPM DE *Drosophila melanogaster*.

En muchos de los genes que codifican proteínas musculares, la transcripción está regulada por la interacción de dos o más activadores de corto alcance (Arnone & Davidson, 1997; Buonanno & Rosenthal, 1996; Hughes & Salinas, 1999; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004; Schiaffino & Reggiani, 1996). A estos activadores se unen combinaciones únicas de factores de transcripción específicos de cada tipo de célula o fibra muscular. Hay distintos tipos de activadores o moduladores en general. Los activadores de largo alcance actúan sobre complejos génicos como los de los genes *Hox* o los genes de *globina* y suelen estar localizados a mucha distancia de los genes sobre los que ejercen su acción (Blackwood & Kadonaga, 1998; Calhoun & Levine, 2003). Su función no está definida totalmente pero existen bastantes evidencias de que estos elementos están implicados en el control de la transcripción génica, mediando la expresión en distintos tipos celulares o controlando los patrones específicos durante el desarrollo en el embrión temprano (Markstein *et al.*, 2002). En cambio, los activadores de corto alcance participan normalmente en la regulación de un único gen y también contienen sitios de unión para factores de transcripción agrupados en “clusters” (Arnone & Davidson, 1997; Buonanno & Rosenthal, 1996; Hughes & Salinas, 1999; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004; Schiaffino & Reggiani, 1996). Estos elementos están implicados en el control de la expresión génica en etapas específicas de desarrollo o en grupos concretos de células y en muchos casos, en los genes musculares, han sido localizados en la región 5' adyacente al gen y/o en el intrón 1 (Banerjee-Basu & Buonanno, 1993; Calvo *et al.*, 2001; Gremke *et al.*, 1993; Hallauer & Hastings, 2002; Hess, 1989; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004; Meredith & Storti, 1993). En algunos de estos estudios también se ha apuntado la idea de que estos activadores, además, puedan estar implicados en los mecanismos que controlan el establecimiento de los niveles adecuados de expresión (Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004).

Las proteínas musculares se acumulan en cantidades diferentes en las fibras pero siempre mantienen una estequiometría muy precisa en cada tipo de fibra. El mantenimiento de esta estequiometría es esencial para mantener la integridad funcional de cada fibra muscular. Más aún, las isoformas presentes en los distintos músculos de un organismo varían, siendo en la mayor parte de los casos específicas de tipo muscular. La regulación de

la transcripción es uno de los mecanismos mejor conocidos implicado en generar diversidad de tipo muscular. La diferenciación de los distintos músculos de un organismo requiere de la ejecución coordinada de programas reguladores que van a determinar la expresión diferencial de genes y la producción de isoformas específicas (Bandman, 1992). Además, la acumulación diferencial de las proteínas estructurales en cada tipo de músculo, de acuerdo a sus propiedades contráctiles específicas, va a contribuir también a la generación de diversidad muscular (Bernstein *et al.*, 1993). En la formación del músculo, los genes que codifican las proteínas musculares necesarias para la elaboración del aparato contráctil se activan coordinadamente en un período muy corto de tiempo.

Uno de los objetivos principales de esta tesis ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos que regulan la transcripción del gen de la *paramiosina/miniparamiosina* (PM/mPM). Este gen codifica dos proteínas del filamento grueso de la fibra muscular de *Drosophila*. El gen PM/mPM de *Drosophila* es un buen modelo para estudiar cómo se regula la expresión de los genes estructurales musculares tanto en *Drosophila* como probablemente en mamíferos dado que los mecanismos moleculares que regulan la formación del músculo son evolutivamente muy antiguos y están conservados en *Drosophila* y vertebrados (Scott, 1994). Nuestro interés en el estudio de este gen se debe a la presencia de dos promotores distintos regulando la expresión de las dos proteínas que codifica. Estos dos promotores funcionan de forma totalmente independiente, no comparten regiones reguladoras de la transcripción y la actividad de uno no se ve influida por la actividad del otro (Arredondo *et al.*, 2001a; Cervera *et al.*, 2004). Un aspecto importante a considerar en este estudio es que el patrón de expresión de estas dos proteínas a lo largo del desarrollo de *Drosophila* es diferente. La Paramiosina (PM) se expresa en la musculatura embrionaria/larvaria y también en la musculatura adulta y por tanto presenta un patrón de expresión similar a la mayor parte de las proteínas sarcoméricas. Así, la Troponina T, la Troponina I, las Troponinas C Ia y Troponinas C Ib, la Tropomiosina 2, las Actinas 57A y 87E y la Miosina, entre otras, presentan el mismo patrón de expresión que la PM (Bernstein *et al.*, 1993; Fyrberg *et al.*, 1994; Fyrberg *et al.*, 1983; Gremke *et al.*, 1993; Herranz *et al.*, 2003; Lovato *et al.*, 2001; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004). En cambio, la Miniparamiosina (mPM) presenta un patrón de expresión exclusivo de la musculatura adulta con una expresión transitoria en las larvas del tercer estadio (Becker *et al.*, 1992;

Maroto *et al.*, 1996). Al menos otras tres proteínas: las Actinas 88F y 79B y la Flightina se expresan exclusivamente en adultos (Fyrberg *et al.*, 1983; Hiromi *et al.*, 1986; Lovato *et al.*, 2001; Nongthomba *et al.*, 2001; Vigoreaux *et al.*, 1993).

1.1 Papel de las cajas E de la región MEF-E del gen PM/mPM.

En *Drosophila*, el papel de MEF2 en la activación de genes musculares estructurales ha sido claramente demostrado (Lilly *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994), pero el papel de los factores miogénicos tipo bHLH (Nautilus y Twist) que se unen a las cajas E no ha estado nunca claro y, menos aún, la cooperación entre ellos (Abmayr & Keller, 1998; Arredondo *et al.*, 2001a; Balagopalan *et al.*, 2001; Michelson *et al.*, 1990). En vertebrados, se ha descrito que la activación de la expresión de los genes musculares requiere la unión a las regiones promotoras de estos genes de dos tipos de factores de transcripción miogénicos, MEF2 y un miembro de la familia MyoD (bHLH). Ambos tipos de factores que interaccionan físicamente y forman un complejo junto con la proteína E de la familia de factores de transcripción bHLH, actúan de una manera cooperativa. Para ello, se requiere la interacción directa al DNA a través de una caja E (CANNTG) o un sitio MEF2 (CTAAAATAA) indistintamente, o también, la unión a los dos sitios que suelen encontrarse cerca uno del otro en algunos genes (Black & Olson, 1998; Molkentin & Olson, 1996).

En la región distal del promotor que controla la expresión de la PM, se identificaron, en un fragmento de 155 pb, un sitio MEF2 y tres cajas E que estaban conservadas en *D. virilis* (Figuras 6 y 7A). En estudios previos del laboratorio se había demostrado que este sitio MEF2 es esencial para alcanzar unos niveles altos de expresión en el estadio embrionario/larvario (Arredondo *et al.*, 2001a). En adultos, sin embargo, su ausencia produce tan sólo una ligera disminución de los niveles de expresión pero conlleva además, una desregulación de la expresión con la pérdida de la especificidad de tipo muscular ya que aparece expresión en los IFM y el mismo fragmento sin mutación es incapaz de dirigir la expresión en estos músculos (Arredondo *et al.*, 2001a). Sin embargo, la delección de la región MEF-E (300pb) producía una disminución mayor de la expresión del transgén en adultos que la producida por la mutación en el sitio MEF2 exclusivamente.

Estos resultados parecían indicar que en esta región existían otros elementos que están involucrados en el control de la expresión de la PM. Entre los candidatos posibles a tener un papel junto con el sitio MEF2 se encontraban las cajas E. Al estudiar los efectos producidos por la introducción de mutaciones en estas cajas E, se ha visto que éstos difieren según el estadio del desarrollo analizado.

En la musculatura embrionaria /larvaria, la mutación de una, dos o las tres cajas E sobre el fragmento de 1,7 kb no produce ningún cambio en la expresión (Figura 7B). En la musculatura de adultos la situación cambia. La mutación de la caja E2, la más próxima al sitio MEF2, no parece tener ningún efecto sobre la expresión del transgén. Sin embargo, la mutación de dos (E1 y E3) o las tres cajas E conlleva una desregulación de la expresión del transgén, ya que en las líneas 1/3EM y 3EM aparece expresión en los IFM (Figura 7B).

Una posible explicación a la falta de efecto de la mutación en la caja E2 podría ser que el hipotético factor bHLH que se uniera a esta secuencia interaccionara con el factor MEF2 y no dependiera de la presencia de esta caja E para realizar su función. Sin embargo, el efecto no es recíproco, ya que al mutar el sitio MEF2 adyacente sí que se observan alteraciones en la expresión. Es posible que existan otros factores que interaccionen con MEF2 y que dependan de la unión de éste al DNA. Otra posible explicación a la ausencia de efecto de la mutación en la caja E2, podría ser que realmente esta caja E no desempeñe ninguna función. Un dato que apoya esta hipótesis es que en *D. pseudoobscura* esta caja E no existe y sin embargo sí están conservadas las cajas E1 y E3 y el sitio MEF2.

Por otra parte, una explicación al efecto producido por la mutación de dos (E1 y E3) o las tres cajas E (Figura 7B) puede ser que se necesite la mutación de, al menos, dos cajas E en la región MEF-E para que se desregule la expresión del transgén, probablemente debido a un debilitamiento de la interacción del complejo o complejos proteicos reguladores que se unan a esta región. Esta interacción también se vería afectada por la mutación en el sitio MEF2. También podría ocurrir que las cajas E1 y E3 tuvieran un efecto represor en IFM. Curiosamente, la secuencia de estas dos cajas E es idéntica, CAGGTG. A este tipo de caja E se ha descrito que se unen varios represores tanto en vertebrados como en *Drosophila*. Concretamente en *Drosophila* se unen a este motivo Snail (Mauhin *et al.*, 1993) y Zfh-1 (Postigo *et al.*, 1999). Estos dos factores desempeñan un papel importante en la diferenciación del mesodermo y del músculo somático respectivamente (Ip *et al.*, 1992;

Postigo *et al.*, 1999). Aunque hasta el momento no se les ha implicado en la regulación directa de genes musculares estructurales es posible que alguno de estos represores u otros todavía no identificados tengan un papel en su regulación espacio-temporal.

1.2 Organización modular del promotor que controla la expresión de la PM.

En la diferenciación muscular de *Drosophila*, además de MEF2, Twist y Nautilus, juegan un papel importante otros factores de transcripción como Tinman (Nkx2.5), Bagpipe, CF2, PDP1 o Biniou (Azpiazu & Frasch, 1993; Bagni *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 1997b; Reddy *et al.*, 2000; Zaffran *et al.*, 2001). La importancia funcional de los motivos de unión a factores miogénicos, y también del número y configuración espacial dentro de los activadores o módulos ha sido enfatizada en distintos modelos (Frith *et al.*, 2001; König *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004)

La integración del análisis funcional *in vivo* y el análisis *in silico* comparando secuencias homólogas de distintas especies de *Drosophila*, ha permitido identificar distintos módulos o elementos funcionales dentro del promotor de la PM. La aplicación de herramientas bioinformáticas nos ha permitido definir mejor los elementos y precisar cuáles son las secuencias que posiblemente juegan un papel esencial en la generación del patrón espacio-temporal. En la región 5' promotora del gen PM/mPM existen dos módulos o elementos reguladores diferentes. A estos dos módulos los hemos denominado Activador Muscular Distal (AMD) y Región Moduladora Proximal (RMP) y están situados aproximadamente entre -2.3 y -1.4 kb y entre -1.4 y 0.55 kb. Estos dos módulos actúan como dos elementos reguladores positivos (Arredondo *et al.*, 2001a). La eliminación del AMD hace que sólo se mantenga una expresión muscular basal y la eliminación de ambos elementos hace que desaparezca la actividad β -galactosidasa en todos los músculos (Arredondo *et al.*, 2001a).

En el activador muscular distal, que incluye la región inicialmente denominada MEF-E, existen en total 3 sitios de unión a MEF2, dos cajas E (E1 y E3) y un sitio CF2, todos ellos conservados en *D. pseudoobscura* (Figuras 9 y 23). Los sitios de unión a factores miogénicos están dispuestos en medio de grandes regiones conservadas (regiones en gris en la figura 23). De hecho, uno de los sitios MEF2 está localizado dentro de una

secuencia de más de 70 pb conservada en un 98%. También se han encontrado varias secuencias de 20-30 pb con más del 90% de conservación entre *D. melanogaster*, *D. virilis* y *D. pseudoobscura*. El Activador Muscular Distal dirige la expresión del transgén, en los músculos hipodérmicos larvarios y de adultos, en TDT, músculos de las patas y músculos viscerales. Con la excepción de los músculos indirectos de vuelo, reproduce el patrón de expresión espacio-temporal de la proteína endógena. Ahora bien, este activador no controla los niveles de expresión como se deduce de la observación de la línea (-2.3/-1.4)PM (Figura 10B). En esta línea se produce una expresión fortísima del transgén en todos los músculos analizados, lo que sugiere la existencia de otros elementos que modulan los niveles de expresión. La Región Moduladora Proximal (RMP), responsable de la expresión basal específica de músculo, junto con el promotor basal, podría estar implicada en la modulación de los niveles de expresión de la proteína en cada tipo de fibra muscular.

En los intrones de los genes *TnT*, *TnI* y *Tm 2* de *Drosophila* se han encontrado elementos similares al Activador Muscular Distal del gen de la PM/mPM (Figura 23). Estos elementos se han denominado IRE (Intronic Regulatory Elements) y dirigen la expresión en los músculos somáticos, viscerales y en los músculos especializados del adulto, IFM y TDT (Gremke *et al.*, 1993; Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004). La comparación de secuencia de estos elementos con el Activador Muscular Distal ha revelado que todos ellos comparten sitios de unión a factores miogénicos, concretamente, 3 sitios de unión a MEF2 y al menos 1 sitio CF2. Estos sitios están dispuestos en medio de grandes regiones conservadas (regiones en gris en la figura 23).

Un aspecto muy importante a resaltar y que ha sido recientemente descrito por nuestro laboratorio y otros (Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004) es que los elementos IRE son responsables del patrón de expresión espacio-temporal correcto de los genes de la *TnT* y la *TnI*, pero por sí solos no son capaces de controlar las cantidades de proteína adecuadas en cada fibra muscular. Para ello, requieren de la interacción concertada con otros elementos situados en la región 5' flanqueante de los genes y que se han denominado URE (Upstream Regulatory Element). Estos elementos también contienen *clusters* con distintas combinaciones de sitios de unión para factores miogénicos.

En el gen de la PM/mPM, el AMD es un activador (*enhancer*) muscular que es responsable de la expresión de la Paramiosina en todos los músculos, excepto en los IFM, pero requiere de la Región Moduladora Proximal (RMP) y quizás del promotor basal endógeno para ajustar los niveles de expresión correctos en cada fibra muscular. El análisis de la expresión en adultos de las líneas (-1.7/-1.4)PM (-1.7/-1.15)PM y (-1.7/-0.76)PM revela una disminución de la expresión del transgén al aumentar el tamaño de la región 3' con respecto a la región MEF-E (Figura 8B). Además, los niveles de expresión observados en (-1.7/-1.4)PM son superiores a los observados en las líneas PM1.7. Todos estos datos indican que en las secuencias 3' respecto a la región MEF-E existen elementos que regulan los niveles de expresión. Esto también engloba a las secuencias localizadas en posición 3' respecto al nucleótido -760 incluyendo al promotor basal homólogo, ya que los niveles observados en las líneas (-1.7/-0.76)PM son menores que los detectados en PM1.7. Otra posible explicación de la reducción de los niveles podría ser el cambio en la distancia del elemento activador, en este caso la región MEF-E, al promotor basal. La interacción del complejo o complejos activadores con la maquinaria basal de transcripción es probable que no ocurra de la misma forma si los elementos de DNA a los que se unen están juntos o separados por 1.4 kb.

La Región Moduladora Proximal (RMP) tiene 2 sitios CF2 y 1 sitio PDP1 que no están conservados en otras especies de *Drosophila*. Sin embargo, uno de los sitios CF2 parece ser funcional *in vivo* ya que su mutación sobre el fragmento de 1.7 kb produce una desregulación de la expresión del transgén en IFM (Datos no mostrados).

El activador que dirige la expresión específica en los músculos indirectos de vuelo todavía no ha sido encontrado. La búsqueda de este elemento ha sido hasta el momento infructuosa y los resultados obtenidos con el intrón 1, aunque contiene regiones pequeñas de 20/30 pares de bases conservadas, son poco claros. Otra posibilidad es que este elemento se encuentre a más de 4kb del sitio de inicio de la transcripción o en otro intrón del gen.

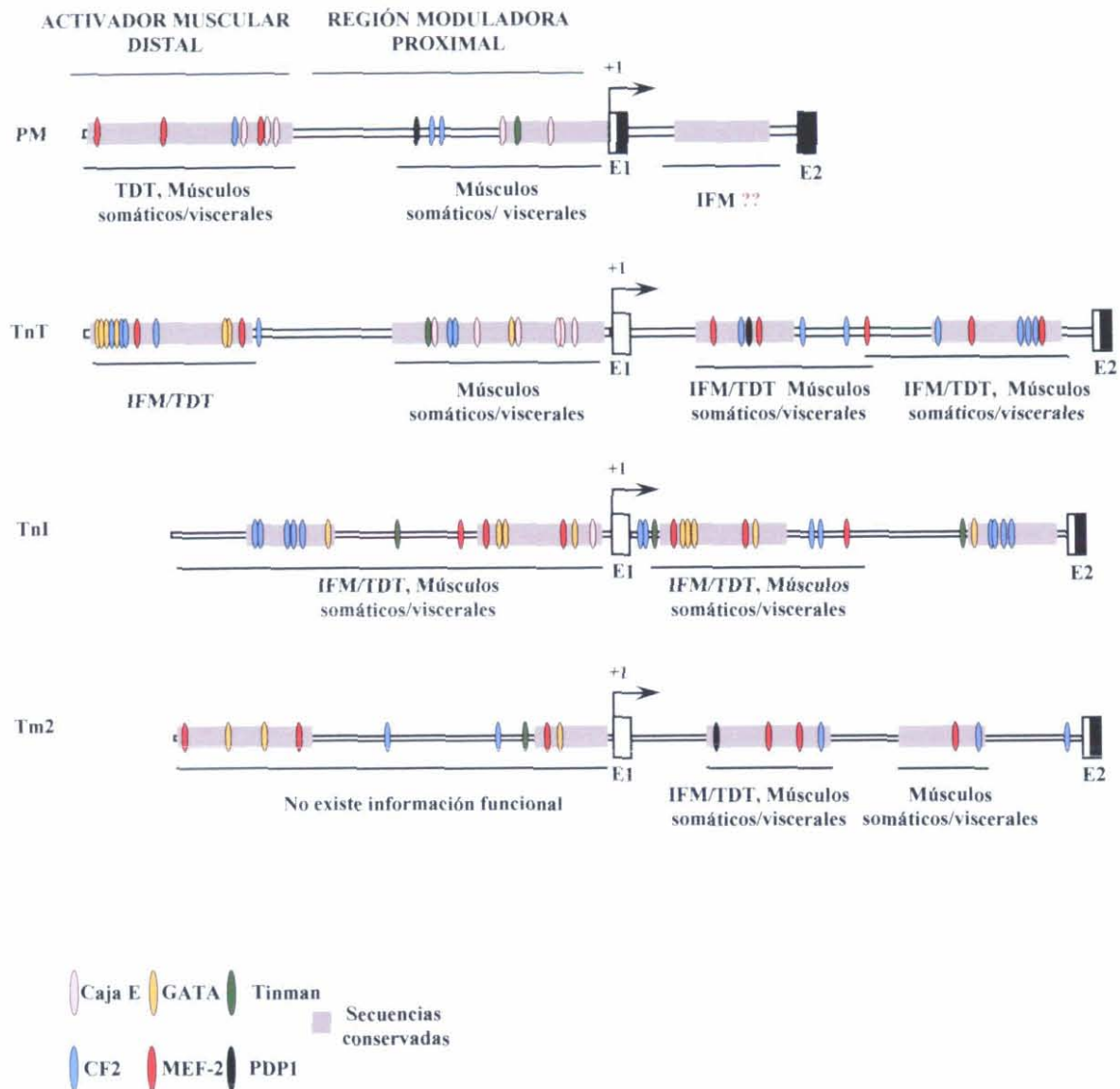


Figura 23. Comparación de las regiones que regulan de la transcripción de la PM, la TnT, la TnI y la Tm2. En los genes que codifican estas proteínas existen varias regiones reguladoras, conservadas en otras especies de *Drosophila* (regiones grises), que se distribuyen en las regiones 5' flanqueantes de los genes (URE) y, al menos en los genes de la TnT, TnI y la Tm2 también en el primer intrón (IRE). En estas regiones conservadas se localizan distintas combinaciones de sitios de unión a factores de transcripción miogénicos. La expresión de la PM en todos los músculos, excepto en IFM, está regulada por un Activador Muscular Distal (AMD) y una Región Moduladora Próxima (RMP). La distribución de estos elementos en la región 5' flanqueante del gen PM/mPM es similar a la descrita para los otros genes. Una posible localización del activador de la expresión de la PM en IFM, es en el intrón 1, donde se ha identificado una región conservada aunque, no se han encontrado motivos de unión para los factores señalados en esta figura.

1.3 Organización modular del promotor que controla la expresión de la mPM.

Las regiones que regulan la transcripción de la mPM están localizadas en el intrón 7 del gen PM/mPM (Arredondo *et al.*, 2001a). A parte del promotor basal de la mPM, en este intrón hay tres regiones altamente conservadas tanto en *Drosophila virilis* como en *D.pseudoobscura* denominadas. AB, BF y TX (Figura 6). Utilizando una estrategia similar a la utilizada para el promotor que regula la expresión de la PM, hemos estudiado la relación funcional de los tres módulos que controlan la expresión de la mPM. En la figura 24, se presenta un modelo de regulación de la transcripción de esta proteína, elaborado en base a los resultados obtenidos. Los módulos AB y TX son dos activadores musculares que controlan la expresión de la mPM en músculos distintos de la larva y del adulto. Así, el módulo TX activa la expresión en larvas de tercer estadio y en todos los músculos del adulto, excepto en IFM (ver Figuras 11 y 12). El módulo AB activa la expresión exclusivamente en los músculos indirectos de vuelo (IFM). Sin embargo, coopera con TX para activar correctamente la expresión en los músculos hipodérmicos del abdomen de las moscas adultas, como se aprecia cuando se comparan los músculos hipodérmicos de adultos en las líneas AB, TX y AB-TX (Figura 12).

El módulo BF no es capaz de activar por sí solo la expresión en ningún tejido, sin embargo, sí realiza un papel modulador de la expresión. De hecho, regula negativamente los niveles de expresión alcanzados por los módulos AB y TX en los músculos sobre los que actúan (Figura 13). Este efecto es muy importante en IFM y mucho menos apreciable en TDT. Sin embargo, seguramente, existan otros elementos que también contribuyan a regular los niveles de expresión producidos por TX, ya que los niveles observados en las líneas BF-TX son todavía mucho más altos que en la línea mP1.7 (Figura 13).

La existencia de dos activadores diferentes para regular la expresión de la Miniparamiosina, obedece seguramente a la necesidad de expresar distintos niveles de la proteína en cada tipo de músculo. Los niveles de mPM en los IFM son muy bajos mientras que en los TDT y en el resto de la musculatura tubular son altos. La presencia de un activador para IFM y otro para el resto de la musculatura asegura las cantidades apropiadas de mPM en cada tipo de músculo y por tanto, el buen funcionamiento de los mismos.

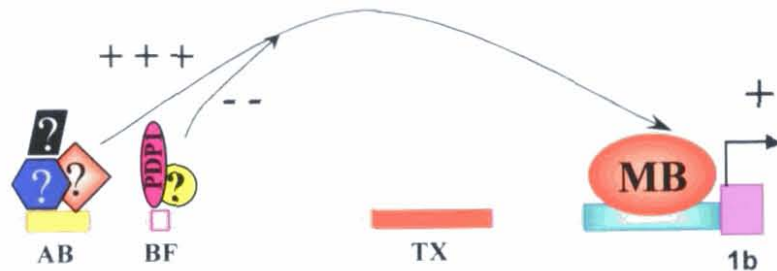
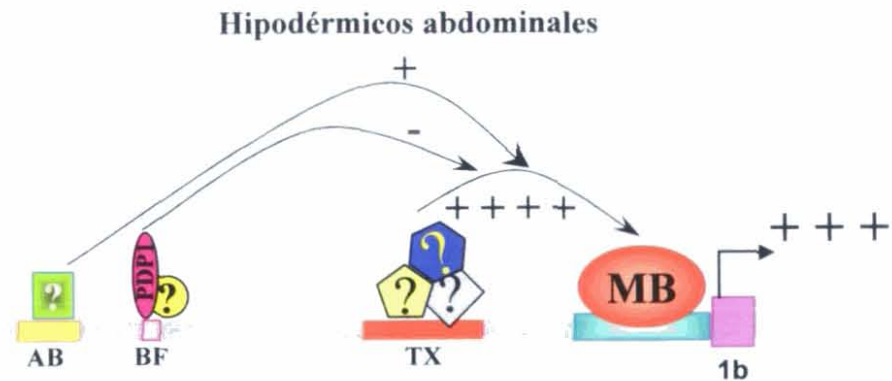
A**Músculos fibrilares (IFM)****B****Músculos tubulares**

Figura 24. Modelo de regulación de la transcripción de la Miniparmin. **A** La expresión de la miniparmin en los músculos fibrilares IFM estaría regulada por la interacción del módulo AB con diferentes factores, algunos de ellos específicos de estos músculos. Estos complejos interaccionarían con la maquinaria basal (MB) de transcripción activando fuertemente la expresión de la proteína. La presencia del elemento BF, a través de la interacción con PDP1 y posiblemente también con otros factores, modularía los niveles de expresión en estos músculos. **B** La expresión en el resto de los músculos del adulto, de naturaleza tubular (TDT, DFM, músculos de las patas, e hipodérmicos abdominales) y en los músculos larvarios estaría regulada fundamentalmente por la interacción de complejos activadores con el módulo TX. Sin embargo, para la correcta expresión en los músculos hipodérmicos abdominales se requiere también la activación por parte del módulo AB. Aunque no está tan claro como en el caso de IFM, el módulo BF también parece regular los niveles de expresión en estos músculos.

Este tipo de organización modular parece ser un rasgo común de los genes musculares estructurales. Como ya se ha comentado antes, es frecuente que existan dos o más activadores que controlen los niveles apropiados de expresión en cada tipo de músculo (Marín *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2004). Un caso más cercano lo encontramos en la regulación de la transcripción de la PM, en donde el activador muscular distal (AMD) controla la expresión en todos los músculos excepto en los IFM y otra región, no identificada todavía, controla la expresión en estos músculos. Una diferencia interesante que se deduce de la comparación de los elementos reguladores identificados en los dos promotores del gen de la PM/mPM, es que los elementos reguladores (AMD y RMP) del promotor de la PM son muy similares a otros descritos en genes musculares con un patrón de expresión a lo largo del desarrollo común. Sin embargo, los elementos reguladores, AB, TX y BF, que controlan la expresión de la mPM, específica de la etapa adulta, son bastante diferentes y, con la excepción de PDP1, no se han identificado *clusters* de sitios de unión a factores miogénicos conocidos.

1.4 PDP1 participa en la regulación de la transcripción de la mPM.

El factor de transcripción PDP1 se une a la región PDP1 en el módulo BF. PDP1 pertenece a la subfamilia PAR de factores de transcripción con cremalleras de leucina y está implicado en la diferenciación terminal de varios tejidos, entre ellos el músculo (Lin *et al.*, 1997b; Reddy *et al.*, 2000). El gen *Pdp1* codifica al menos seis isoformas, tres de las cuales, α , β y δ , están presentes en músculo somático. Se han descrito sitios de unión para PDP1 en muchos de los genes musculares de *Drosophila* estudiados como la TnT, la PM o la Tm2 (Arredondo *et al.*, 2001a; Lin & Storti, 1997a; Mas *et al.*, 2004).

El sitio de unión de este factor a BF es un tanto distinto a la secuencia consenso descrita, lo que explica que no fuera identificado previamente mediante un análisis de la secuencia. Esta unión ha sido comprobada *in vitro* con ensayos de retardo en gel e *in vivo* mediante el análisis de la expresión de β -galactosidasa dirigida por los módulos BF y TX en un fondo mutante para PDP1. En las larvas BF-TX mutantes para PDP1 se observa una importante reducción de la expresión en los músculos de la cabeza de las larvas con respecto a las líneas sin mutación. Dado que los niveles de expresión del transgén en estos

músculos en las líneas TX y en las líneas BF-TX son similares, es posible que el efecto observado con los mutantes no se deba exclusivamente al sitio PDP1 localizado en BF. Si fuera así probablemente se observaría un aumento de los niveles de expresión en las líneas BF-TX con respecto a la expresión generada por TX. Un dato que apoya esta hipótesis es la presencia de un sitio PDP1 en el módulo TX similar al identificado en BF. Sería interesante confirmar la funcionalidad de este sitio analizando la expresión en las líneas TX sobre un fondo mutante PDP1. Además, sería importante analizar la contribución de este factor a la expresión en el estadio adulto, sin embargo, la incapacidad de los mutantes de llegar a adultos imposibilita el análisis de la expresión de la mPM en esta etapa.

En la regulación de la expresión del gen *Tm 2* este factor coopera con MEF2 para activar la transcripción en todos los músculos (Lin *et al.*, 1997b). En todos los genes mencionados anteriormente se han descrito sitios de unión para MEF2 más o menos cercanos a los sitios PDP1, sin embargo, en las regiones reguladoras de la mPM no se han encontrado sitios de unión para MEF2. Es posible que la regulación de genes específicos de adulto o por lo menos de algunos, no dependa directamente de MEF2. Aunque tampoco descartamos que MEF2 interaccione con las regiones reguladoras de la mPM a través de sitios que no se ajusten exactamente a la secuencia consenso de unión descrita para este factor. El gen *D-mef2* codifica varias isoformas (Gunthorpe *et al.*, 1999) y es posible que éstas tengan diferentes preferencias de sitios de unión.

Todos los datos obtenidos hasta el momento sugieren que el mecanismo de regulación de la mPM es similar al de otros genes musculares estructurales. Sin embargo, sigue abierta la cuestión de qué es lo que impide que esta proteína se exprese en el estadio embrionario. Probablemente, la necesidad de factores de transcripción específicos de adulto y/o el reclutamiento de represores en el estadio embrionario sean las respuestas.

2. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LA TROPONINA T EN LOS MÚSCULOS INDIRECTOS DE VUELO

La correcta estequiometría de las proteínas musculares es fundamental para el perfecto ensamblaje de los sarcómeros y por tanto para el buen funcionamiento de los músculos. En este trabajo hemos estudiado los efectos producidos por la sobreexpresión del componente del filamento fino Troponina T, en unos músculos altamente especializados como son los músculos indirectos de vuelo (IFM). Esta sobreexpresión conlleva fuertes alteraciones, tanto bioquímicas como estructurales, que interfieren con la funcionalidad de este músculo.

2.1 El aumento de los niveles de TnT provoca una disminución de la acumulación de esta proteína.

Nuestros resultados muestran que un ligero aumento de los niveles de TnT en los IFM de las líneas OTnT, detectado en las primeras etapas de la formación de este músculo (Figura 19), conlleva una posterior reducción de los niveles de la misma. El promotor del gen *actina 88F* se ha utilizado con éxito para sobreexpresar en los IFM otras proteínas musculares como la Miniparamiosina, la cadena pesada de la miosina, o la propia Actina 88F (Arredondo *et al.*, 2001b; Cripps *et al.*, 1994; Hiromi *et al.*, 1986). En ninguno de estos casos se ha observado la reducción de los niveles de estas proteínas en respuesta a la sobreexpresión, lo que indica que el efecto observado en las líneas OTnT es específico de la TnT.

Además de la reducción de la TnT en las líneas OTnT se observa, sorprendentemente, una disminución de los niveles del resto de los componentes de filamento fino, sin verse afectados los del filamento grueso. Esto produce una disminución de filamentos finos interfiriendo con el correcto ensamblaje de los sarcómeros (Figura 22). En los mutantes en la TnT de *Drosophila*, *upheld*², y *upheld*³, en los que los IFM presentan una profunda desorganización, se había observado una disminución de los niveles de Tm y de la Actina (Fyrberg *et al.*, 1990). También, en los mutantes en la TnT cardiaca del pez cebra, *silent heart (sih)* los niveles de la Tm y de la TnI están reducidos. Todos estos

mutantes tienen en común que los niveles de TnT están muy reducidos o son nulos, ya que las mutaciones afectan al procesamiento del mRNA o la transcripción del gen (Sehnert *et al.*, 2002). Se ha descrito que es esencial la unión de la TnT con la Tm para aumentar la afinidad de ésta por la Actina (Hinkle *et al.*, 1999; Palm *et al.*, 2001). La ausencia o disminución de TnT disminuiría la unión de la Tm al filamento de actina aumentando la inestabilidad de éste (Wegner, 1982). Esto podría explicar la disminución de los niveles de las proteínas del filamento fino en estos mutantes. Posiblemente, la disminución de los componentes del filamento fino en las líneas OTnT también sea una consecuencia de la reducción de TnT. Sin embargo, a diferencia de los mutantes, la disminución de TnT en estas líneas es una consecuencia del aumento inicial en los niveles de expresión de la misma.

¿Por qué el aumento de TnT conlleva una reducción de la cantidad de esta proteína? Una explicación podría ser que el aumento de la concentración de TnT en el citoplasma de la célula muscular conlleve la aparición de interacciones inapropiadas, que interfieran con la formación del filamento fino. Se ha descrito que la región α -hélice de la TnT cardiaca de vertebrados, responsable de la interacción con la Tm, a concentraciones altas es capaz de formar homodímeros *in vitro* (Palm *et al.*, 2001). Esta región está altamente conservada a lo largo de la evolución. Sin embargo, para que la TnT se una estequiométricamente a la Tm, tiene que ser monomérica. Podría ocurrir, que un aumento en la concentración de TnT en los IFMs de *Drosophila* favoreciera la formación de homodímeros impidiendo así su unión con la Tm. Estos homodímeros serían rápidamente degradados, disminuyendo así los niveles de TnT y provocando un efecto similar al observado en los mutantes anteriormente descritos.

Otra posible explicación es que el fenotipo observado en las líneas OTnT se produzca por la expresión de la TnT transgénica en un momento diferente a la de la TnT endógena debido al promotor del gen *actina* 88F. Es posible que en este momento la TnT no pueda incorporarse al filamento fino debido a la falta de otros componentes de esta estructura, con lo que se produciría un aumento de TnT soluble en el citoplasma. Este aumento de proteína no ensamblada provocaría la degradación de la misma. Se ha descrito una ruta (*Unfolded Protein Response*), conservada desde levaduras hasta mamíferos, que se encarga de eliminar de la célula aquellas proteínas que, por alguna alteración, no se han

plegado o ensamblado correctamente en el retículo endoplásmico, con el fin de limitar el daño celular (Ma & Hendershot, 2001). Es posible, que el aumento de TnT soluble en el citoplasma ponga en marcha algún mecanismo similar. Otra posibilidad es que la expresión de la TnT a destiempo altere el orden de incorporación de los distintos componentes al filamento fino, produciendo filamentos finos aberrantes incapaces de ensamblarse en sarcómeros que serían degradados rápidamente.

2.2 El aumento de TnT en los IFM conlleva una reducción de la síntesis de las proteínas del filamento fino.

La disminución de los niveles de mRNAs de los componentes del filamento fino, incluida la propia TnT, en las líneas OTnT indica que la reducción de la cantidad de estas proteínas no se debe únicamente a la degradación de las mismas, sino también a una reducción de su síntesis.

En los mutantes de la TnT cardíaca *sih* del pez cebra también se ha observado una reducción del mRNA de la Tm (Sehnert *et al.*, 2002). Estos autores sugieren la existencia de un mecanismo *feedback* que coordina estrechamente la expresión de las proteínas del filamento fino. La reducción de la síntesis de las otras proteínas no se ha observado ni con la sobreexpresión, ni la mutación de otros componentes del filamento fino, lo que indica que la TnT juega un papel clave en este mecanismo. Es posible que la TnT, por algún mecanismo todavía desconocido, regule positivamente la transcripción de las otras proteínas, de modo que la ausencia o disminución de esta proteína produzca una disminución de la transcripción de las otras. Pero además, hay que destacar que en las líneas OTnT también hay una reducción de la síntesis de la propia TnT. En el caso de la *Unfolded Protein Response*, comentada anteriormente, además de eliminar las proteínas mal plegadas o ensambladas, se ha descrito que hay una atenuación de la síntesis de las mismas (Ma & Hendershot, 2001). Es posible que si el aumento de TnT es reducido por este mecanismo o alguno similar, además de eliminar la proteína, reduciría la síntesis de la misma desencadenando todo el proceso.

Si la TnT es esencial para activar la transcripción de los otros componentes, es posible también, que la rápida disminución de esta proteína en las líneas OTnT en respuesta

a un aumento de la expresión sea un mecanismo de control para evitar la sobreexpresión de todas las proteínas del filamento fino. En este caso, podría ocurrir también que la propia TnT regulara su propia transcripción con el fin de evitar la sobreexpresión de la misma. De modo que el aumento de los niveles de TnT por encima de los límites normales regularía negativamente la síntesis de la misma.

Recientemente, varios trabajos sugieren que la TnT es la proteína reguladora más importante del sarcómero (Schwartz & Mercadier, 2003). A parte de ser esencial en el ensamblaje del filamento fino (Hinkle *et al.*, 1999; Palm *et al.*, 2001) y aportar sensibilidad al Ca^{2+} al mismo (Potter *et al.*, 1995), tiene también un importante papel regulador de la contracción, favoreciendo un estado conformacional del filamento fino que inhibe la interacción con la miosina (Maytum *et al.*, 2002; Tobacman *et al.*, 2002). Además, la alteración de la TnT cardíaca es una de las causas más frecuentes de cardiomiopatía hipertrófica familiar (Hernandez *et al.*, 2001; Thierfelder *et al.*, 1994). Por todo esto, no sería de extrañar que la expresión de la TnT fuera un determinante clave para la expresión del resto de las proteínas del filamento fino.

En cualquier caso, la correcta estequiometría de la TnT es esencial para la formación del filamento fino. Cambios en los niveles de expresión de esta proteína, ya sea por aumento o disminución de la misma, interfieren con el ensamblaje del filamento fino y por tanto con la función muscular. Ésto indica la necesidad de una finísima regulación del gen que la codifica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) En la región 5' flanqueante del gen de la PM /mPM existen dos elementos reguladores positivos localizados entre las posiciones -2.3 y -1.4 y las posiciones -1.4 y -0.55 que hemos denominado AMD (Activador Muscular Distal) y RMP (Región Moduladora Proximal) respectivamente.
- 2) El activador muscular distal (AMD) de 900 pb tiene tres sitios de unión a MEF2, tres cajas E y un sitio CF2 localizados en medio de grandes fragmentos conservados. El AMD dirige niveles altos de expresión en los músculos somáticos, viscerales y en los TDT. Este activador requiere la presencia de la región moduladora proximal (RMP) y del promotor basal para ajustar los niveles de expresión en cada tipo de fibra muscular.
- 3) Las cajas E de la región MEF-E no intervienen en la expresión de la PM en el estadio embrionario-larvario. Sin embargo, las cajas E1 y E3 son necesarias para el establecimiento del correcto patrón de expresión de la PM en el estadio adulto, ya que su falta produce una desregulación de la expresión del transgén.
- 4) Se han identificado elementos similares al AMD en los genes de la TnT, la TnI y la Tm 2. Todos ellos, contienen tres sitios de unión a MEF2 y un sitio CF2. Estos elementos dirigen la expresión en los músculos somáticos, viscerales y en todos o parte de los músculos especializados del adulto.
- 5) En el promotor que controla la expresión de la mPM se han identificado tres elementos reguladores conservados: dos activadores musculares (AB y TX) y un modulador de la expresión (BF).
- 6) AB es un activador específico de los músculos indirectos de vuelo, mientras que TX activa la expresión en el resto de los músculos. Se requiere la cooperación entre AB y TX para la expresión apropiada en los músculos hipodérmicos abdominales.

- 7) El elemento BF no posee capacidad activadora por sí solo pero regula los niveles de expresión alcanzados por los módulos AB y TX en los músculos torácicos, siendo esta regulación más evidente en los IFM que en TDT.
- 8) El factor de transcripción PDPI interacciona con el módulo BF y está involucrado, al menos, en la expresión de la mPM en los músculos larvarios de la cabeza.
- 9) Se requiere la presencia de los tres módulos, AB, BF y TX para conseguir los niveles adecuados de mPM en cada tipo de fibra muscular.
- 10) La sobreexpresión de la TnT en los músculos indirectos de vuelo produce una disminución de la acumulación y síntesis de esta proteína y también de la del resto de componentes del filamento fino. Este efecto interfiere con el ensamblaje de los sarcómeros provocando graves alteraciones en la estructura y función de estos músculos.

BIBLIOGRAFÍA

Abmayr, S. M. & Keller, C. A. (1998). Drosophila myogenesis and insights into the role of nautilus. *Curr Top Dev Biol* **38**, 35-80.

Arnone, M. I. & Davidson, E. H. (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* **124**, 1851-1864.

Arredondo, J. J. (1999). Regulación transcripcional del gen de la Paramiosina/Miniparamiosina de *Drosophila melanogaster*. Análisis funcional de la Miniparamiosina. Tesis doctoral.

Arredondo, J. J., Mardahl-Dumesnil, M., Cripps, R. M., Cervera, M. & Bernstein, S. I. (2001b). Overexpression of miniparamyosin causes muscle dysfunction and age-dependant myofibril degeneration in the indirect flight muscles of *Drosophila melanogaster*. *J Muscle Res Cell Motil* **22**, 287-299.

Arredondo, J. J., Marco-Ferreres, R., Maroto, M., Cripps, R. M., Marco, R., Bernstein, S. I. & Cervera, M. (2001a). Control of *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene expression. Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription. *J Biol Chem* **276**, 8278-8287.

Azpiaz, N. & Frasch, M. (1993). tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* **7**, 1325-1340.

Azpiaz, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P. & Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev* **10**, 3183-3194.

Bagni, C., Bray, S., Gogos, J. A., Kafatos, F. C. & Hsu, T. (2002). The *Drosophila* zinc finger transcription factor CF2 is a myogenic marker downstream of MEF2 during muscle development. *Mech Dev* **117**, 265-268.

Balagopalan, L., Keller, C. A. & Abmayr, S. M. (2001). Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila nautilus* gene is not essential for embryonic myogenesis or viability. *Dev Biol* **231**, 374-382.

Bandman, E. (1992). Contractile protein isoforms in muscle development. *Dev Biol* **154**, 273-283.

Banerjee-Basu, S. & Buonanno, A. (1993). cis-acting sequences of the rat troponin I slow gene confer tissue- and development-specific transcription in cultured muscle cells as well as fiber type specificity in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **13**, 7019-7028.

Barolo, S., Carver, L. A. & Posakony, J. W. (2000). GFP and beta-galactosidase transformation vectors for promoter/enhancer analysis in *Drosophila*. *Biotechniques* **29**, 726, 728, 730, 732.

Barral, J. M. & Epstein, H. F. (1999). Protein machines and self assembly in muscle organization. *Bioessays* **21**, 813-823.

Barton, P. J., Mullen, A. J., Cullen, M. E., Dhoot, G. K., Simon-Chazottes, D. & Guenet, J. L. (2000). Genes encoding troponin I and troponin T are organized as three paralogous pairs in the mouse genome. *Mamm Genome* **11**, 926-929.

Basi, G. S. & Storti, R. V. (1986). Structure and DNA sequence of the tropomyosin I gene from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* **261**, 817-827.

Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791-804.

Bate, M. & Arias, A. M. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* **112**, 755-761.

Bate, M. & Martinez Arias, A. (1993).

The development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Baylies, M. K. & Bate, M. (1996). twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* **272**, 1481-1484.

Baylies, M. K., Bate, M. & Ruiz Gomez, M. (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* **93**, 921-927.

Becker, K. D., O'Donnell, P. T., Heitz, J. M., Vito, M. & Bernstein, S. I. (1992).

Analysis of *Drosophila* paramyosin: identification of a novel isoform which is restricted to a subset of adult muscles. *J Cell Biol* **116**, 669-681.

Bennett, P., Craig, R., Starr, R. & Offer, G. (1986). The ultrastructural localization of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **7**, 550-567.

Bennett, P. M. & Elliott, A. (1984). "Splicing" of paramyosin filaments. *J. Mol. Biol.* **175**, 103-109.

Benoist, P., Mas, J. A., Marco, R. & Cervera, M. (1998). Differential muscle-type expression of the *Drosophila* troponin T gene. A 3-base pair microexon is involved in visceral and adult hypodermic muscle specification. *J Biol Chem* **273**, 7538-7546.

Bernstein, S. I., O'Donnell, P. T. & Cripps, R. M. (1993). Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*. *Int Rev Cytol* **143**, 63-152.

Black, B. L. & Olson, E. N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 167-196.

- Blackwood, E. M. & Kadonaga, J. T. (1998).** Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* **281**, 61-63.
- Bodmer, R. (1993).** The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* **118**, 719-729.
- Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B. & Schwartz, K. (1998).** Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circ Res* **83**, 580-593.
- Brault, V., Reedy, M. C., Sauder, U., Kammerer, R. A., Aebi, U. & Schoenenberger, C. (1999).** Substitution of flight muscle-specific actin by human (beta)-cytoplasmic actin in the indirect flight muscle of *Drosophila*. *J Cell Sci* **112** (Pt 21), 3627-3639.
- Buckingham, M., Houzelstein, D., Lyons, G., Ontell, M., Ott, M. O. & Sassoon, D. (1992).** Expression of muscle genes in the mouse embryo. *Symp Soc Exp Biol* **46**, 203-217.
- Buckingham, M. E. (1994).** Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 745-751.
- Buonanno, A. & Rosenthal, N. (1996).** Molecular control of muscle diversity and plasticity. *Dev Genet* **19**, 95-107.
- Calhoun, V. C. & Levine, M. (2003).** Long-range enhancer-promoter interactions in the Scr-Antp interval of the *Drosophila* Antennapedia complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9878-9883.
- Calvo, S., Vullhorst, D., Venepally, P., Cheng, J., Karavanova, I. & Buonanno, A. (2001).** Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **21**, 8490-8503.

Campos-Ortega, J. A. & Hartenstein, V. (1985). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. New York: Springer-Verlag.

Carmena, A., Bate, M. & Jimenez, F. (1995). Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **9**, 2373-2383.

Cervera, M., Arredondo, J. J. & Marco-Ferreres, R. (2004). Paramyosin and Miniparamyosin. In *Nature's versatile engine. Insect flight muscle inside and out*. Edited by J. O. Vigoreaux: Landers Bioscience Publishers.

Cohen, C. & Holmes, K. C. (1963). X-ray diffraction evidence for alpha-helical coiled-coils in native muscle. *J Mol Biol* **6**, 423-432.

Cohen, C. & Parry, D. A. (1998). A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *J Struct Biol* **122**, 180-187.

Cripps, R. M., Becker, K. D., Mardahl, M., Kronert, W. A., Hodges, D. & Bernstein, S. I. (1994). Transformation of *Drosophila melanogaster* with the wild-type myosin heavy-chain gene: rescue of mutant phenotypes and analysis of defects caused by overexpression. *J Cell Biol* **126**, 689-699.

Cripps, R. M., Black, B. L., Zhao, B., Lien, C. L., Schulz, R. A. & Olson, E. N. (1998). The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* **12**, 422-434.

Crossley, A. C. (1978). The morphology and development of the *Drosophila* muscular system. In *The genetics and biology of Drosophila.*, pp. 499-560. Edited by M. Ashburner & T. R. F. Wright. London: Academic Press.

- Currie, D. A. & Bate, M. (1991).** The development of adult abdominal muscles in *Drosophila*: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* **113**, 91-102.
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M. C., Glossop, N. R., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V. & Blau, J. (2003).** vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* **112**, 329-341.
- Domingo, A., Gonzalez-Jurado, J., Maroto, M., Diaz, C., Vinos, J., Carrasco, C., Cervera, M. & Marco, R. (1998).** Troponin-T is a calcium-binding protein in insect muscle: in vivo phosphorylation, muscle-specific isoforms and developmental profile in *Drosophila melanogaster*. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 393-403.
- Einheber, S. & Fischman, D. A. (1990).** Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: an intracellular member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2157-2161.
- Emerson, C. P., Jr. & Bernstein, S. I. (1987).** Molecular genetics of myosin. *Annu Rev Biochem* **56**, 695-726.
- Fernandes, J., Bate, M. & Vijayraghavan, K. (1991).** Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development* **113**, 67-77.
- Flucher, B. E. (1992).** Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev Biol* **154**, 245-260.
- Frasch, M. (1995).** Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **374**, 464-467.
- Frith, M. C., Hansen, U. & Weng, Z. (2001).** Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* **17**, 878-889.

Fyrberg, C., Parker, H., Hutchison, B. & Fyrberg, E. (1994). *Drosophila melanogaster* genes encoding three troponin-C isoforms and a calmodulin-related protein. *Biochem Genet* **32**, 119-135.

Fyrberg, C. C., Labeit, S., Bullard, B., Leonard, K. & Fyrberg, E. (1992). *Drosophila* projectin: relatedness to titin and twitchin and correlation with lethal(4) 102 CDa and bent-dominant mutants. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **249**, 33-40.

Fyrberg, E., Fyrberg, C. C., Beall, C. & Saville, D. L. (1990). *Drosophila melanogaster* troponin-T mutations engender three distinct syndromes of myofibrillar abnormalities. *J Mol Biol* **216**, 657-675.

Fyrberg, E. A., Mahaffey, J. W., Bond, B. J. & Davidson, N. (1983). Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. *Cell* **33**, 115-123.

Gajewski, K., Kim, Y., Lee, Y. M., Olson, E. N. & Schulz, R. A. (1997). D-mef2 is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development. *Embo J* **16**, 515-522.

Geyer, P. K. & Fyrberg, E. A. (1986). 5'-flanking sequence required for regulated expression of a muscle-specific *Drosophila melanogaster* actin gene. *Mol Cell Biol* **6**, 3388-3396.

Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.

Gooset, L., Kelvin, D., Sternberg, E. & Olson, E. N. (1989). A new myocyte-specific enhancer binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* **9**, 5022-5033.

- Gremke, L., Lord, P. C., Sabacan, L., Lin, S. C., Wohlwill, A. & Storti, R. V. (1993).** Coordinate regulation of *Drosophila* tropomyosin gene expression is controlled by multiple muscle-type-specific positive and negative enhancer elements. *Dev Biol* **159**, 513-527.
- Gunthorpe, D., Beatty, K. E. & Taylor, M. V. (1999).** Different levels, but not different isoforms, of the *Drosophila* transcription factor DMEF2 affect distinct aspects of muscle differentiation. *Dev Biol* **215**, 130-145.
- Hallauer, P. L. & Hastings, K. E. (2002).** TnIfast IRE enhancer: multistep developmental regulation during skeletal muscle fiber type differentiation. *Dev Dyn* **224**, 422-431.
- Hanke, P. D. & Storti, R. V. (1988).** The *Drosophila melanogaster* tropomyosin II gene produces multiple proteins by use of alternative tissue-specific promoters and alternative splicing. *Mol Cell Biol* **8**, 3591-3602.
- Harris, H. E. & Epstein, H. F. (1977).** Myosin and paramyosin of *Caenorhabditis elegans*: biochemical and structural properties of wild-type and mutant proteins. *Cell* **10**, 709-719.
- Hernandez, O. M., Housmans, P. R. & Potter, J. D. (2001).** Invited Review: pathophysiology of cardiac muscle contraction and relaxation as a result of alterations in thin filament regulation. *J Appl Physiol* **90**, 1125-1136.
- Herranz, R., Díaz-Castillo, C., Nguyen, T. P., Lovato, T. L., Cripps, R. M. & Marco, R. (2003).** Expression patterns of the whole Troponin C gene repertoire during *Drosophila* development. *Gene Expression Patterns* **In press**.
- Hess, N., Kronert, W.A. and Bernstein, S.I. (1989).** Transcriptional and post-transcriptional regulation of *Drosophila* myosin heavy chain expression. *Cell. Mol. Biol. Muscle Dev.*, 621-631.

Hinkle, A., Goranson, A., Butters, C. A. & Tobacman, L. S. (1999). Roles for the troponin tail domain in thin filament assembly and regulation. A deletional study of cardiac troponin T. *J Biol Chem* **274**, 7157-7164.

Hiromi, Y., Okamoto, H., Gehring, W. J. & Hotta, Y. (1986). Germline transformation with *Drosophila* mutant actin genes induces constitutive expression of heat shock genes. *Cell* **44**, 293-301.

Hoppe, P. E. & Waterston, R. H. (1996). Hydrophobicity variations along the surface of the coiled-coil rod may mediate striated muscle myosin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **135**, 371-382.

Huang, Q. Q. & Jin, J. P. (1999). Preserved close linkage between the genes encoding troponin I and troponin T, reflecting an evolution of adapter proteins coupling the Ca(2+) signaling of contractility. *J Mol Evol* **49**, 780-788.

Hughes, S. M. & Salinas, P. C. (1999). Control of muscle fibre and motoneuron diversification. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 54-64.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J., eds (1990). *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego, CA: Academic Press.

Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. & Levine, M. (1992). dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1518-1530.

Kagawa, H., Gengyo, K., McLachlan, A. D., Brenner, S. & Karn, J. (1989). Paramyosin gene unc-15 of *Caenorhabditis elegans*. Molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *J. Mol. Biol.* **207**, 311-333.

Kelly, K. K., Meadows, S. M. & Cripps, R. M. (2002). *Drosophila* MEF2 is a direct regulator of Actin57B transcription in cardiac, skeletal, and visceral muscle lineages. *Mech Dev* **110**, 39-50.

Konig, S., Burkman, J., Fitzgerald, J., Mitchell, M., Su, L. & Stedman, H. (2002). Modular organization of phylogenetically conserved domains controlling developmental regulation of the human skeletal myosin heavy chain gene family. *J Biol Chem* **277**, 27593-27605.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Leptin, M. & Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* **110**, 73-84.

Lilly, B., Galewsky, S., Firulli, A. B., Schulz, R. A. & Olson, E. N. (1994). D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5662-5666.

Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B. M., Schulz, R. A. & Olson, E. N. (1995). Requirements of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* **267**, 688-693.

Lin, M. H., Bour, B. A., Abmayr, S. M. & Storti, R. V. (1997). Ectopic expression of MEF2 in the epidermis induces epidermal expression of muscle genes and abnormal muscle development in *Drosophila*. *Dev Biol* **182**, 240-255.

Lin, S. C. & Storti, R. V. (1997a). Developmental regulation of the *Drosophila* Tropomyosin I (TmI) gene is controlled by a muscle activator enhancer region that contains multiple cis-elements and binding sites for multiple proteins. *Dev Genet* **20**, 297-306.

Lin, S. C., Lin, M. H., Horvath, P., Reddy, K. L. & Storti, R. V. (1997b). PDP1, a novel *Drosophila* PAR domain bZIP transcription factor expressed in developing mesoderm, endoderm and ectoderm, is a transcriptional regulator of somatic muscle genes.

Development **124**, 4685-4696.

Liu, H., Mardahl-Dumesnil, M., Sweeney, S. T., O'Kane, C. J. & Bernstein, S. I. (2003). *Drosophila* paramyosin is important for myoblast fusion and essential for myofibril formation. *J Cell Biol* **160**, 899-908.

Lovato, T. L., Meadows, S. M., Baker, P. W., Sparrow, J. C. & Cripps, R. M. (2001). Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types. *Insect Mol Biol* **10**, 333-340.

Ma, Y. & Hendershot, L. M. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* **107**, 827-830.

Marín, M. C., Rodríguez, J. R. & Ferrús, A. (2004). Transcription of *Drosophila* Troponin I gene is regulated by two conserved, functionally identical, synergistic elements. *Mol Biol Cell* **In press**.

Markstein, M., Markstein, P., Markstein, V. & Levine, M. S. (2002). Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 763-768.

Maroto, M., Arredondo, J. J., San Roman, M., Marco, R. & Cervera, M. (1995). Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct paramyosin isoform, widely distributed in invertebrates. *J Biol Chem* **270**, 4375-4382.

Maroto, M., Arredondo, J., Goulding, D., Marco, R., Bullard, B. & Cervera, M. (1996). *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in

quantity, localization, and isoform pattern: a possible role in muscle maturation and function. *J Cell Biol* **134**, 81-92.

Mas, J. A., Garcia-Zaragoza, E. & Cervera, M. (2004). Two functionally identical modular enhancers in *Drosophila* Troponin T gene establish the correct protein levels in different muscle types. *Mol Biol Cell* **April**. In press.

Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C. & Alberga, A. (1993). Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* **21**, 3951-3957.

Maytum, R., Geeves, M. A. & Lehrer, S. S. (2002). A modulatory role for the troponin T tail domain in thin filament regulation. *J Biol Chem* **277**, 29774-29780.

McKinsey, T. A., Zhang, C. L. & Olson, E. N. (2002). Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 763-772.

McLachlan, A. D. & Karn, J. (1982). Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature* **299**, 226-231.

Meredith, J. & Storti, R. V. (1993). Developmental regulation of the *Drosophila* tropomyosin II gene in different muscles is controlled by muscle-type-specific intron enhancer elements and distal and proximal promoter control elements. *Dev Biol* **159**, 500-512.

Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Bate, M., Arias, A. M. & Maniatis, T. (1990). Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* **4**, 2086-2097.

Molkentin, J. D. & Olson, E. N. (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9366-9373.

Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. & Olson, E. N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**, 1125-1136.

Nguyen, H. T., Bodmer, R., Abmayr, S. M., McDermott, J. C. & Spoerel, N. A. (1994). D-mef2: a Drosophila mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7520-7524.

Nongthomba, U., Pasalodos-Sanchez, S., Clark, S., Clayton, J. D. & Sparrow, J. C. (2001). Expression and function of the Drosophila ACT88F actin isoform is not restricted to the indirect flight muscles. *J Muscle Res Cell Motil* **22**, 111-119.

Ogut, O. & Jin, J. P. (1996). Expression, zinc-affinity purification, and characterization of a novel metal-binding cluster in troponin T: metal-stabilized alpha-helical structure and effects of the NH2-terminal variable region on the conformation of intact troponin T and its association with tropomyosin. *Biochemistry* **35**, 16581-16590.

Ohtsuki, I. & Nagano, K. (1982). Molecular arrangement of troponin-tropomyosin in the thin filament. *Adv Biophys* **15**, 93-130.

Olson, E. N. & Klein, W. H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to live out. *Genes Dev* **8**, 1-8.

Palm, T., Graboski, S., Hitchcock-DeGregori, S. E. & Greenfield, N. J. (2001). Disease-causing mutations in cardiac troponin T: identification of a critical tropomyosin-binding region. *Biophys J* **81**, 2827-2837.

- Paululat, A., Holz, A. & Renkawitz-Pohl, R. (1999a).** Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev* **83**, 17-26.
- Paululat, A., Breuer, S. & Renkawitz-Pohl, R. (1999b).** Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* **296**, 151-160.
- Perry, S. V. (1998).** Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 575-602.
- Postigo, A. A., Ward, E., Skeath, J. B. & Dean, D. C. (1999).** *zfh-1*, the *Drosophila* homologue of ZEB, is a transcriptional repressor that regulates somatic myogenesis. *Mol Cell Biol* **19**, 7255-7263.
- Potter, J. D., Sheng, Z., Pan, B. S. & Zhao, J. (1995).** A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *J Biol Chem* **270**, 2557-2562.
- Raghavan, K. V. & Pinto, L. (1985).** The cell lineage of the muscles of the *Drosophila* head. *J Embryol Exp Morphol* **85**, 285-294.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J. D., Olson, E. N. & Schulz, R. A. (1995).** A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **171**, 169-181.
- Reddy, K. L., Wohlwill, A., Dzitoeva, S., Lin, M. H., Holbrook, S. & Storti, R. V. (2000).** The *Drosophila* PAR domain protein 1 (*Pdp1*) gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins through the use of multiple enhancers and promoters. *Dev Biol* **224**, 401-414.

- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R. & Leptin, M. (1997).** Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* **124**, 2915-2922.
- Ruiz Gomez, M. & Bate, M. (1997).** Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* **124**, 4857-4866.
- Ruiz-Gomez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jackle, H. & Bate, M. (1997).** Specific muscle identities are regulated by Kruppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **124**, 3407-3414.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning, a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiaffino, S. & Reggiani, C. (1996).** Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* **76**, 371-423.
- Schwartz, K. & Mercadier, J. J. (2003).** Cardiac troponin T and familial hypertrophic cardiomyopathy: an energetic affair. *J Clin Invest* **112**, 652-654.
- Scott, M. P. (1994).** Intimations of a creature. *Cell* **79**, 1121-1124.
- Sehnert, A. J., Huq, A., Weinstein, B. M., Walker, C., Fishman, M. & Stainier, D. Y. (2002).** Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet* **31**, 106-110.
- Seidman, J. G. & Seidman, C. (2001).** The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* **104**, 557-567.
- Sparrow, J. C. (1995).** Flight and phosphorylation. *Nature* **373**, 592-593.

- Spradling, A. C. & Rubin, G. M. (1982).** Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-347.
- Squire, J. M. & Morris, E. P. (1998).** A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *Faseb J* **12**, 761-771.
- Standiford, D. M., Davis, M. B., Miedema, C., Franzini-Amstrong, C. & Emerson, C. P., Jr. (1997).** Myosin rod protein: a novel thick filament component of *Drosophila* muscle. *J. Mol. Biol.* **265**, 40-55.
- Stockdale, F. E. (1997).** Mechanisms of formation of muscle fiber types. *Cell Struct Funct* **22**, 37-43.
- Sullivan, W., Ashurner, M. & Scott Hawley, R. (2000).** *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Taylor, M. V. (1998).** Muscle development: a transcriptional pathway in myogenesis. *Curr Biol* **8**, R356-358.
- Taylor, M. V. (2002).** Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr Biol* **12**, R224-228.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H. P., Seidman, J. G. & Seidman, C. E. (1994).** Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* **77**, 701-712.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C. & Perrin-Schmitt, F. (1988).** Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *Embo J* **7**, 2175-2183.

Thummel, C. S., Boulet, A. M. & Lipshitz, H. D. (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445-456.

Tobacman, L. S., Nihli, M., Butters, C., Heller, M., Hatch, V., Craig, R., Lehman, W. & Homsher, E. (2002). The troponin tail domain promotes a conformational state of the thin filament that suppresses myosin activity. *J Biol Chem* **277**, 27636-27642.

Tohtong, R., Yamashita, H., Graham, M., Haeblerle, J., Simcox, A. & Maughan, D. (1995). Impairment of muscle mutant caused by mutation of phosphorylation sites in myosin regulatory light chain. *Nature* **373**, 650-653.

Vigoreaux, J. O. & Perry, L. M. (1994). Multiple isoelectric variants of flightin in *Drosophila* stretch-activated muscles are generated by temporally regulated phosphorylation. *J. Mus. Res. Cell. Motil* **15**, 607-616.

Vigoreaux, J. O., Saide, J. D., Valgeirsdottir, K. & Pardue, M. L. (1993). Flightin, a novel myofibrillar protein of *Drosophila* stretch-activated muscles. *J Cell Biol* **121**, 587-598.

Vigoreaux, J. O., Hernandez, C., Moore, J., Ayer, G. & Maughan, D. (1998). A genetic deficiency that spans the flightin gene of *Drosophila melanogaster* affects the ultrastructure and function of the flight muscles. *J Exp Biol* **201** (Pt 13), 2033-2044.

Vinós, J., Domingo, A., Marco, R. & Cervera, M. (1991). Identification and characterization of *Drosophila melanogaster* paramyosin. *J Mol Biol* **220**, 687-700.

Vinós, J., Maroto, M., Garesse, R., Marco, R. & Cervera, M. (1992). *Drosophila melanogaster* paramyosin: developmental pattern, mapping and properties deduced from its complete coding sequence. *Mol Gen Genet* **231**, 385-394.

Wang, J. & Jin, J. P. (1998). Conformational modulation of troponin T by configuration of the NH₂-terminal variable region and functional effects. *Biochemistry* **37**, 14519-14528.

Watkins, H., McKenna, W. J., Thierfelder, L., Suk, H. J., Anan, R., O'Donoghue, A., Spirito, P., Matsumori, A., Moravec, C. S., Seidman, J. G. & et al. (1995). Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* **332**, 1058-1064.

Wegner, A. (1982). Kinetic analysis of actin assembly suggests that tropomyosin inhibits spontaneous fragmentation of actin filaments. *J Mol Biol* **161**, 217-227.

Wells, L., Edwards, K. A. & Bernstein, S. I. (1996). Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *Embo J* **15**, 4454-4459.

Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I. & Schacherer, F. (2000). TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* **28**, 316-319.

Yin, Z., Xu, X. L. & Frasch, M. (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development* **124**, 4971-4982.

Zaffran, S., Kuchler, A., Lee, H. H. & Frasch, M. (2001). binou (FoxF), a central component in a regulatory network controlling visceral mesoderm development and midgut morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev* **15**, 2900-2915.

ANEXO

PUBLICACIONES

- **Arredondo, J. J., Marco-Ferreres, R., Maroto, M., Cripps, R. M., Marco, R., Bernstein, S. I. & Cervera, M. (2001a).** Control of *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene expression. Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription. *J Biol Chem* **276**, 8278-8287.
- **Cervera, M., Arredondo, J. J. & Marco-Ferreres, R. (2004).** Paramyosin and Miniparamyosin. In *Nature's versatile engine. Insect flight muscle inside and out*. Edited by J. O. Vigoreaux: Landers Bioscience Publishers.

Control of *Drosophila* Paramyosin/Miniparamyosin Gene Expression

DIFFERENTIAL REGULATORY MECHANISMS FOR MUSCLE-SPECIFIC TRANSCRIPTION*

Received for publication, October 11, 2000

Published, JBC Papers in Press, November 10, 2000, DOI 10.1074/jbc.M009302200

Juan J. Arredondo^{‡§}, Raquel Marco Ferreres[‡], Miguel Maroto^{‡§¶}, Richard M. Cripps^{¶*},
Roberto Marco[‡], Sanford I. Bernstein[¶], and Margarita Cervera^{‡ §§}

From the [‡]Departamento de Bioquímica & Instituto Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain and the [¶]Department of Biology and Molecular Biology Institute, San Diego State University, San Diego, California 92182-4614

To define the transcriptional mechanisms contributing to stage- and tissue-specific expression of muscle genes, we performed transgenic analysis of *Drosophila* paramyosin gene regulation. This gene has two promoters, one for paramyosin and one for miniparamyosin, which are active in partially overlapping domains. Regions between –0.9 and –1.7 kilobases upstream of each initiation site contribute to the temporal and spatial expression patterns. By comparing the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* promoters, conserved binding sites were found for known myogenic factors, including one MEF2 site and three E boxes. In contrast with previous data, our experiments with the paramyosin promoter indicate that the MEF2 site is essential but not sufficient for proper paramyosin gene transcription. Mutations in the three E boxes, on the other hand, do not produce any effect in embryonic/larval muscles. Thus MEF2 site- and E box-binding proteins can play different roles in the regulation of different muscle-specific genes. For the miniparamyosin promoters, several conserved sequences were shown to correspond to functionally important regions. Our data further show that the two promoters work independently. Even when both promoters are active in the same muscle fiber, the transcription driven by one of the promoters is not affected by transcription driven by the other.

The correct patterning and differentiation of muscles require the coordinate execution of regulatory programs. These include the differential expression of muscle genes and the production

of specific protein isoforms (1). Muscle genes are activated coordinately. Their transcription is regulated by DNA sequences, promoters, and enhancers, which permit the interaction with unique combinations of transcription factors in each cell type. Myogenesis has a determinative stage in which mesodermal precursors become myoblasts and a differentiation stage involving the fusion of single myoblasts to form multinucleated myotubes that express the contractile protein genes. In vertebrates this occurs during embryogenesis; two families of transcriptional factors, MyoD and MEF2, are essential to the transcription of muscle structural genes and are critical for the stable determination of myoblast lineages (2, 3). In skeletal muscles, MyoD and MEF2 work cooperatively in muscle gene activation (2, 4). The MyoD family is exclusively expressed in somatic muscles, in contrast to mef2 genes that are expressed in skeletal, cardiac, and smooth muscles. This suggests that MyoD-type proteins play important roles in activating transcription within each myogenic lineage (5). The analysis of MEF2 functions has been facilitated by the isolation of the *Drosophila* mef2 gene (6, 7). This single gene is required for differentiation of skeletal, cardiac, and visceral muscles (8, 9).

The *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene (PM^{1/}mPM) represents a good model system to elucidate muscle gene regulatory mechanisms. Previous studies have suggested that the molecular pathways controlling muscle formation are ancient and evolutionarily conserved in flies and vertebrates (10). Interest in studying expression of PM/mPM is enhanced by the fact that the two mRNAs arise from overlapping transcriptional units. The mPM promoter is located inside a PM intron that is 8 kb downstream of the PM promoter (11, 12). Whereas PM is expressed at the two distinct stages in all muscles, as are most other *Drosophila* muscle proteins, mPM is present only in the adult musculature. The two proteins are expressed at the same stage of adult development, suggesting that regulation of the two promoters has to be coordinated (13).

Drosophila develops distinct sets of muscles during its life cycle, with separate muscles at the embryonic/larval stages and in the adult (14). Myoblast determination and differentiation occur independently at each phase (15). During embryogenesis, mesodermal precursors appear at gastrulation during ventral furrow formation. Body wall muscles and some visceral muscles are derived from precursor myoblasts expressing the twist gene (16–18). The second phase of myogenesis occurs several

* This work was supported by Grants PB94–0093, PB96–0069, and PB97–0014 from the Spanish Ministry of Education (to R. M. and M. C.) and grants from the Muscular Dystrophy Association and the National Science Foundation (MCB9604546) (to S. I. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AJ243067, AJ243068, AJ243069, and AJ243070.

§ Supported by a predoctoral fellowship from the Universidad Autónoma de Madrid with funds provided by the Spanish Ministry of Education and the European Space Agency.

¶ Current address: Institut de Biologie du Développement du Marseille, Laboratoire de Génétique et Physiologie de Développement, Centre National de la Recherche Scientifique, Campus de Luminy, Case 907, 13288 Marseille Cedex 09, France.

** Current address: Dept. of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM 87131-1091.

§§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-397-5402; Fax: 34-91-585-4587; E-mail: margarita.cervera@uam.es.

¹ The abbreviations used are: PM, paramyosin; mPM, miniparamyosin; kb, kilobase(s); IFM, indirect flight muscles; TDT, tergal depressor of the trochanter; bp, base pair(s); PCR, polymerase chain reaction; NAU, nautilus; GFP, green fluorescent protein; EMSA, electrophoretic mobility shift assay.

days later during metamorphosis. The specialized adult muscles, including the indirect flight muscles (IFM) and the tergal depressor of the trochanter (TDT), form during pupation when most larval muscles are histolyzed (19–22).

Identification of *Drosophila* muscle promoter/enhancer sequences and their associated binding factors has not been nearly as extensive as in vertebrates. The majority of identified transcription factors are required for mesoderm formation. *twist* and *snail* are involved in establishing the mesoderm germ layer; *tinman* is exclusively expressed in the dorsal vessel muscle primordia; and *bagpipe* is involved in the development of visceral muscles (23–25). *Nautilus*, the MyoD homologue, is expressed in some so-called founder cells, a subset of myoblast cells of the somatic mesoderm probably involved in formation and/or patterning of embryonic body wall muscles (26–28). However, no targets of NAU are known. DMEF2 is expressed in all muscle lineages, where it is required for differentiation (2, 6, 7, 17). CF2 (29) and PDP1 (30, 31) also have been described as ubiquitous factors with important roles in muscle development. However, little is known about how muscle gene expression is regulated in adults and how the expression is coordinated between the embryonic/larval muscles and the adult musculature.

In this article, we study the regulation of the PM/mPM gene by linking the LacZ gene to putative PM/mPM regulatory sequences and analyzing gene expression *in vivo* in germline transformants. Our findings define an important role for the myogenic regulatory factor MEF2 and implicate this and other factors binding to a number of conserved elements as being required for development of the larval and adult musculature.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Isolation of Genomic Clones, Construction of P-transformation Plasmids, and Generation of Transformed *Drosophila* Lines—*Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* genomic clones (12) containing the 5' upstream regions from the transcriptional initiation sites of the PM and mPM were subcloned and sequenced as described (32). Selected fragments from these regions were cloned into P-transformation vectors with native orientations relative to the basal promoters. +1 bp on our map refers to the main initiation starts of the PM and mPM (12). The P element plasmid vectors (33) were pCasper β-gal for all constructs, with the exception of the mP1.7 construct (pCasper hs40 LacZ) and the LG, LGD, and LGL constructs (pCasper 4). The artificial intron was made joining the *SalI/AflIII* fragment from the 5' end of intron 8 with the *Apal/PstI* fragment from the 3' end of intron 8. The GFP gene for the mPGFP plasmid was obtained from the pGREEN Lantern plasmid (Life Technologies, Inc.). Constructs LG, LGD, and LGL were made by joining the corresponding fragments from PM4i and mPGFP in the proper orientation. Mutations of the MEF2 site and E boxes were carried out by PCR as described (34) with the oligonucleotides CGGTGCTACTCAGAAGCGAAAAT (MEF2), GTTGGCCTGAGGAGAAATGTGTG (E1), TAGTTAGGGAAAAGTGTGTTTGT (E2), and GTGGAGCAGAGGAGGAGGCGATC (E3). Bold letters indicate the introduced changes in the original sequence.

Generation of germline transgenic flies using the P element-mediated transformation technique was essentially as described (35). Between one and eight lines from each construct were analyzed for expression.

Embryo, Larvae, and Adult Staining—β-galactosidase enzyme activity was assayed in larvae and adults of transgenic lines as described (36), with minor modifications. Third instar larvae and 1-day-old flies were microdissected, fixed, and stained as described (37). The levels of β-galactosidase activity were used as a means of comparing the transcriptional efficiency between different constructs. A rough quantification of expression levels in larval and adult muscles among different constructs was achieved by visual monitoring of the timed appearance of the blue reaction products from the X-gal substrate/β-galactosidase reaction. *In situ* hybridization was carried out as described (38).

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reactions and Sequencing—Reverse transcriptase-PCR was performed according to standard protocols (39). Oligonucleotides spanning different sequences of the PM and mPM promoter regions and the LacZ gene were used as primers. Sequencing was carried out by an automatic sequencer (Applied Bio-

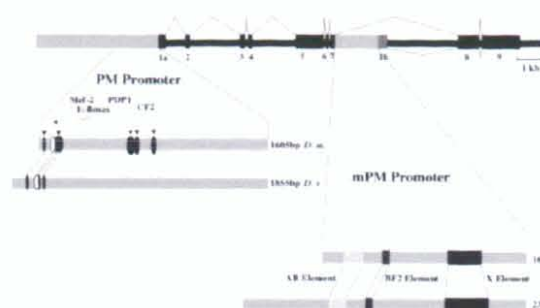


FIG. 1. Conserved regions in the sequences upstream of the PM/mPM gene in *D. melanogaster* and *D. virilis*. The upper part shows a schematic representation of the *D. melanogaster* PM/mPM gene. Exons are shown as black boxes and are specified by number. The lower part shows the alignment of the sequences upstream of the start sites of the PM and mPM transcription units in the *D. melanogaster* and *D. virilis* genes. Proximal regions of both transcriptional units are conserved (12). In addition, one binding site for MEF2 at –1488 and three E boxes at –1587, –1461, and –1436 in the *D. melanogaster* PM promoter are conserved in *D. virilis*. In the same region, two CF2 sites and two PDP1 sites are present in *D. melanogaster* but not in *D. virilis*. In the upstream sequences of the mPM transcription unit, three regions are conserved in sequence and position. These are located at –477 to –740 (X element), –1173 to –1207 (BF2 element), and –1342 to –1469 (AB element).

systems) as described by the manufacturer. GCG software (version 7.1) was used for sequence analysis (40).

RNA Purification and Northern Hybridization—Total RNA from adult flies was purified, and Northern blot analysis was performed as described previously (41).

Nucleotide Sequence Accession Numbers—The complete 5' upstream regions from the initiation sites of paramyosin and miniparamyosin from *D. melanogaster* and *D. virilis* have been submitted to GenBank™/EBI Data Bank under accession numbers AJ243067, AJ243068, AJ243069, and AJ243070.

RESULTS

Distinct Conserved Elements Are Present in the Distal 5' Regions of the PM/mPM Genes of *D. melanogaster* and *D. virilis*—As an initial step in the identification of transcriptional enhancer sequences of the PM/mPM gene in *D. melanogaster*, we isolated the PM/mPM homologue from a distantly related species, *D. virilis*. These two *Drosophilidae* species diverged more than 50 million years ago, and sequence comparison is useful for detecting conserved regulatory features. Previous studies (12) revealed that regions extending 90–100 nucleotides upstream of the PM and mPM transcriptional initiation sites are over 90% conserved, indicating that they may correspond to RNA polymerase complex binding domains.

The alignment of the more distal sequences allowed identification of *cis* elements important for muscle expression (Fig. 1). For the sequences 5' to the PM start sites, the only homologies are the proximal region, one binding site for MEF2 at –1488, and three E boxes at –1587, –1461, and –1436 in *D. melanogaster*. The interaction between MEF2 and MyoD regulates muscle gene expression in vertebrates (2, 4). Thus, having an MEF2 site and several E boxes within 150 bp makes this region worth studying in more detail. Near this region two CF2 sites (29) and two PDP1 sites (30, 31) at –947 and –929 are found. These are not conserved in *D. virilis*.

When the same comparison studies were performed with the mPM putative promoter regions (Fig. 1), three conserved regions were identified. These regions, conserved in sequence and position, are 81–91% identical. These are the X element between nucleotides –477 and –740, BF2 at –1207 and –1173, and AB at –1469 and –1343 of the *D. melanogaster* mPM initiation site (Fig. 1).

In Vivo Analysis of 5' Upstream Regions Involved in PM and

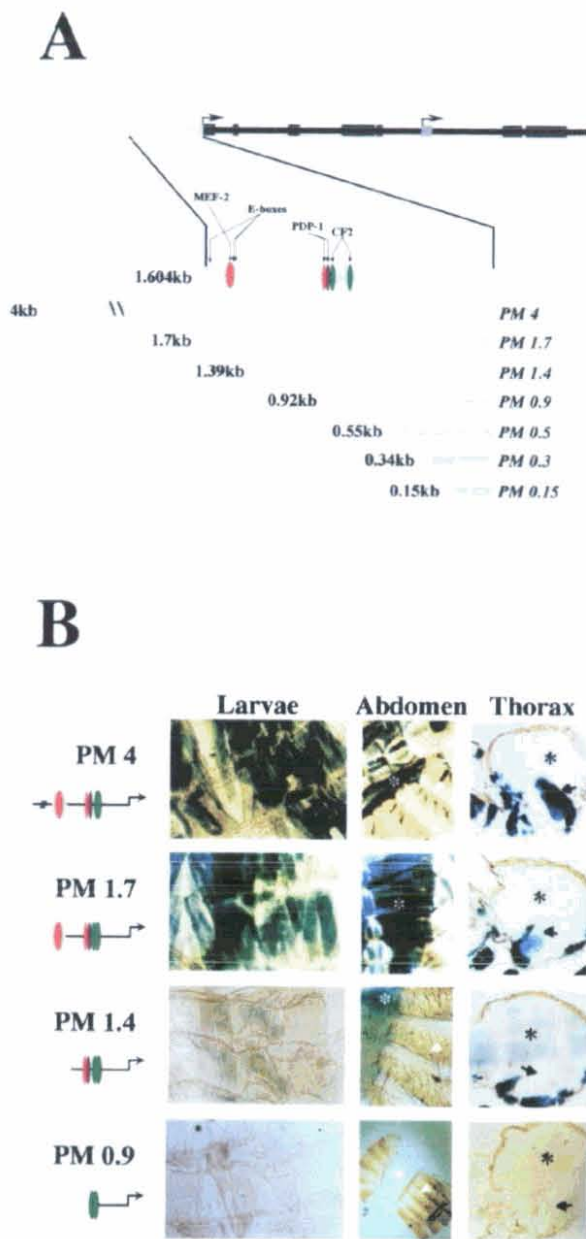


FIG. 2. Comparison of β -galactosidase gene expression driven by selected sequences upstream from the PM transcription start site. *A*, constructs inserted in the pCasper β -gal plasmid, identified by name and size. *B*, X-gal staining of third instar larvae, dissected abdomens, and thin sections of thoraces transformed with constructs containing 5' sequences of 4 kb (PM 4), 1.69 kb (PM 1.7), 1.38 kb (PM 1.4), and 0.87 kb (PM 0.9). White asterisk, hypodermic ventral muscles and white arrowhead, hypodermic dorsal muscles; black asterisk, IFM; black arrow, TDT.

mPM Expression—To determine the regions regulating the expression of PM and mPM, based on the comparative analysis described above, constructs were made and analyzed by P element-mediated transformation. The transgenic lines transformed with constructs containing 4-kb (PM4) or 2.7-kb (mP 2.7) fragments upstream from the transcription start sites of the PM or mPM, respectively, express *LacZ* at high levels with similar patterns as the endogenous proteins, except for the TDT and IFM (Figs. 2 and 3). The PM4 lines do not express the transgene in IFM muscles (Fig. 2 and Table I). In contrast, the

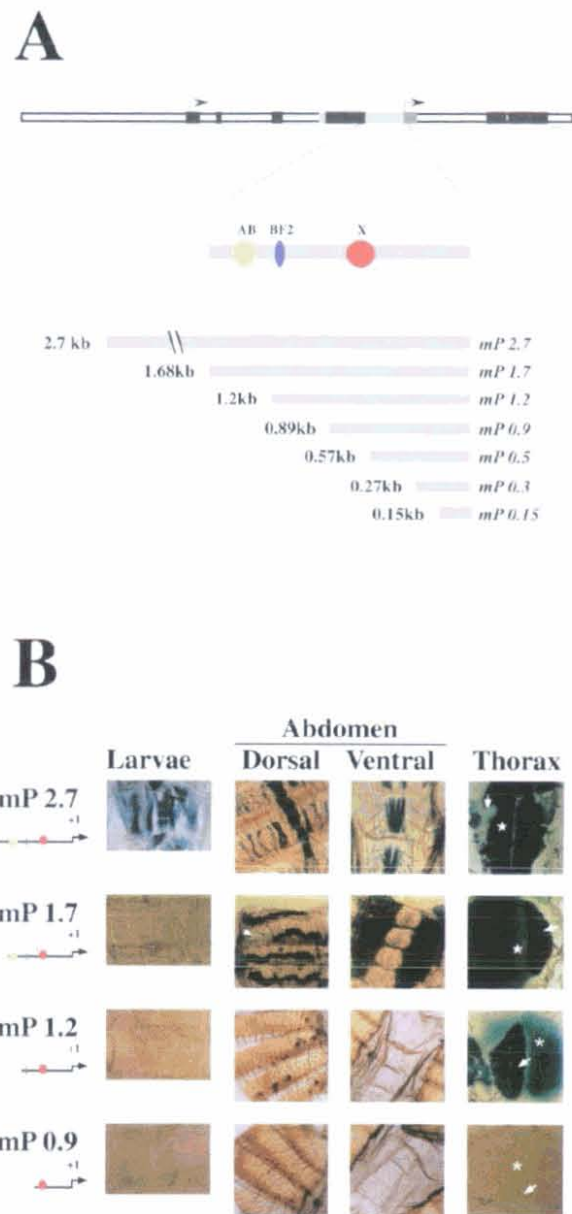


FIG. 3. Comparison of β -galactosidase gene expression driven by selected sequences upstream from the mPM transcription start site. *A*, constructs inserted in the pCasper β -gal plasmid, identified by name and size. *B*, X-gal staining of third instar larvae, dissected abdomens, and thin sections of thoraces transformed with constructs containing 5' sequences of 2.7 kb (mP 2.7), 1.68 kb (mP 1.7), 1.2 kb (mP 1.2), 0.89 kb (mP 0.9), and 0.57 kb (mP 0.5). asterisk, IFM; arrow, TDT. The strong staining in dorsal abdomen of mP 1.7 line is nonspecific. The specific staining is indicated with the arrowhead.








mP 2.7 lines showed β -galactosidase staining in IFM but not in TDT muscles (Fig. 3 and Table II). In fact, the *LacZ* expression patterns in the thoracic muscles of these lines reflect an inverse situation to the levels of endogenous protein accumulation. These results indicate that all the regulatory elements are located in the regions cloned in these constructs, except for those controlling the expression of PM in IFM.

To more precisely define elements necessary for PM expression, constructs containing fragments of 1.7 (PM 1.7), 1.39 (PM 1.4), 0.92 (PM 0.9), 0.55 (PM 0.5), 0.34 (PM 0.3), and 0.15 (PM 0.15) kb from the PM initiation site were generated (Fig. 2).

TABLE I

Comparison of *LacZ* gene expression driven by selected sequences upstream from the start site of the PM transcription unit

The highest expressing lines, PM4, achieved the maximal blue intensity for most muscles and are referred to as "+++", The level of intensity of the other lines was determined by comparison to these lines, nd, none detected.


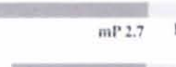
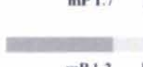
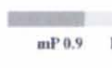


		β -galactosidase Expression								
		Analyzed Lines	Abdomen				Visceral			
			TDT	IFM	Dorsal	Ventral	Muscles	Larvae		Embryo
		5	+++	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PM 4	Lac Z									
		8	++	—	++	++	++	++	++	++
PM 1.7	Lac Z									
		8 ^m	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
PM 1.4	Lac Z									
		5	—	—	—	—	—	—	—	nd
PM 0.9	Lac Z									
		2	—	—	—	—	—	—	—	—
PM 0.5	Lac Z									
		1	—	—	—	—	—	—	—	—
PM 0.3	Lac Z									
		1	—	—	—	—	—	—	—	—
PM 0.15	Lac Z									

* 1/8 lines do not give any detectable *LacZ* expression.

TABLE II

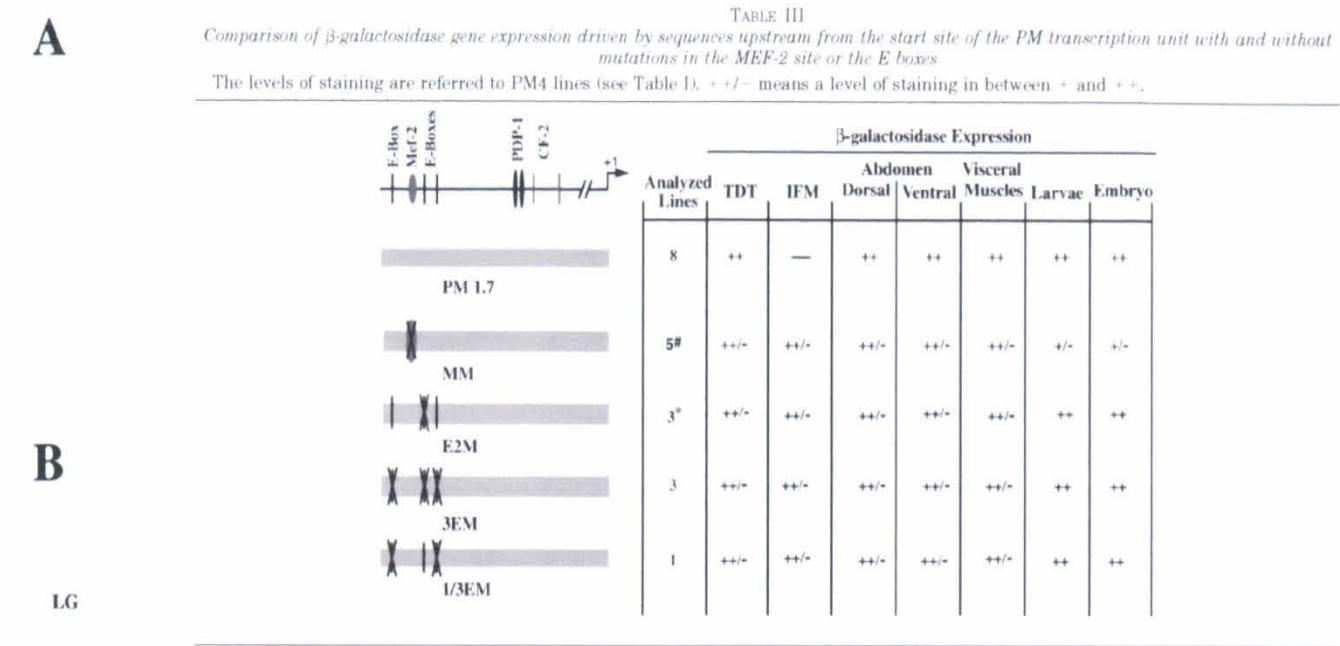
Comparison of β -galactosidase gene expression driven by selected sequences upstream from the start site of the mPM transcription unit

The highest expressing construct, mP 2.7, achieved the maximal blue intensity for most muscles and is referred to as "+++", The level of intensity of the other lines was determined by comparison to these lines, nd, none detected.

		β-galactosidase Expression							
		Analyzed lines	Abdomen				Visceral		Embryo
			TDT	IFM	Dorsal	Ventral	Muscles	Larvae	
		4	—	+++	++	++	++	++	—
mP 2.7	Lac Z								
		3	++	++	+	+	++	—	nd
mP 1.7	Lac Z								
		2	++	+	—	—	+	—	—
mP 1.2	Lac Z								
		1	—	—	—	—	—	—	nd
mP 0.9	Lac Z								
		9	—	—	—	—	—	—	nd
mP 0.5	Lac Z								
		4	—	—	—	—	—	—	—
mP 0.3	Lac Z								
		3	—	—	—	—	—	—	—
mP 0.15	Lac Z								

Analysis of the transgenic lines revealed that 5' upstream sequences of less than 0.9 kb (PM 0.9, PM 0.5, PM 0.3, and PM 0.15) do not express significant levels of β -galactosidase, as measured by enzyme staining in embryos, larvae, or adults (Fig. 2; data not shown). Reverse transcriptase-PCR assays on the PM 0.3 and PM 0.15 lines revealed very low levels of *LacZ* transcription (data not shown). The region implicated (from -0.9 to -1.7 kb) contains the conserved MEF2 site and E boxes and also the PDP1 sites and one of the CF2 sites described above (Figs. 1 and 2). *In vitro* transcribed-translated DMEF2, NAU, PDP1, and CF2 products bind specifically to these sequences (data not shown). No binding was detected with TWIST.

Detailed analysis of transgenic lines with constructs containing intermediate length fragments (PM 1.7 and PM 1.4) established the importance of the putative regulatory sites in these constructs. In the PM 1.7 lines, containing the MEF-E region, flies express significant levels of *LacZ* in all muscles including leg and visceral muscles, but not IFMs. Except for a slightly lower level of expression, the pattern is the same as the one obtained with the PM4 construct. Surprisingly, the absence of the MEF-E region in the PM 1.4 lines yields *LacZ* expression in all muscles. Although the absence of this region markedly diminished the *LacZ* expression (Fig. 2 and Table I), it does not abolish it completely. In fact, β -galactosidase staining appears in all muscles including IFM.



the E boxes do not produce any effect in embryonic/larval muscles. In adult muscles, although none of these sites seem to be essential for expression, they appear to be required for the proper regulation of PM expression, because mutations in these sites produce IFM staining.

Paramyosin and Miniparamyosin Expression in Adult Muscles Is Not Coordinated—Although the endogenous PM is expressed in IFM, our data show that the element controlling expression of PM in IFMs is not present in regions analyzed at the 5' end of PM. Because the PM/mPM gene contains two overlapping transcriptional units, it is possible that the IFM-controlling element(s) of mPM also drives PM expression in IFMs in a coordinated fashion.

To investigate whether PM and mPM transcription is coordinated, we studied the coexpression of the *LacZ* and *GFP* genes under the control of the PM and mPM promoters, respectively. The main limitation of the previous approach is the possible influence of enhancers located close to the insertion region in the chromosome. If the two transcriptional units are situated in the same construct, then positional effects could be ruled out because they would basically influence the two transcriptional units at the same time. Three constructs were made and analyzed by P element-mediated transformation (Fig. 5). The first construct, LG, was designed to reproduce the situation of the endogenous PM/mPM gene. The 5' upstream region controlling PM (4 kb) drives the expression of *LacZ*, and the 5' upstream region controlling mPM (2.7 kb) drives the *GFP* gene. The distance between *LacZ* and *GFP* initiation sites is similar to the PM and mPM initiation sites in the endogenous gene. Moreover, to allow correct splicing of the two possible transcripts, an artificial intron (basically intron 8 without the middle region; see "Experimental Procedures"), followed by the SV40 polyadenylation signal, was placed downstream of the *GFP* gene. The generated lines should produce two transcripts: 1) *LacZ* carrying at its end exons 5, 6, and 7 of the PM/mPM gene and 2) *GFP*. If cooperation exists between the promoters, *LacZ* and *GFP* muscle expression in these lines should be different compared with the PM 4 and mP 2.7 lines. In a second construct, LGD, a fragment with the artificial intron and the polyadenylation signal, was included downstream of the *LacZ* gene to make both transcriptional units independent. In the third construct, LGI, the orientation of one of the transcriptional units was reversed. Lines LGD and LGI may produce two transcripts, *LacZ* (in this case without exons 5, 6, and 7) and *GFP*. Two more constructs were made as a control, PM4i (PM) and mPGFP (mPM) in which PM and mPM promoters were independently fused upstream of the respective reporter genes. They also contained the fragment with the artificial intron and the polyadenylation signal. Several transgenic lines were obtained (Fig. 5 and Table IV).

Analysis of *LacZ* and *GFP* expression showed that both temporal and spatial expression patterns were similar to those obtained previously in the lines transformed with constructs containing 4-kb (PM4 and PM4i) or 2.7-kb (mP 2.7 and mPGFP) fragments. Thus, LG, LGD, and LGI lines express β -galactosidase at high levels with the same pattern as the PM endogenous protein, except in the IFM. On the other hand, they express *GFP* at high levels in all muscles as the mPM endogenous protein, except for the TDT.






To establish whether transcription was correctly carried out, Northern blot analyses (Fig. 6) were performed with total RNAs from late pupae of the LG, LGD, and LGI lines. LG lines basically present two bands, corresponding to the *LacZ* and *GFP* transcripts with the expected size. Thus, the *LacZ* transcript appears as a band of higher size, *LacZ* plus exons 5, 6, and 7. In the LGD lines, besides the expected *LacZ* and *GFP* transcripts, we detect an additional higher band, a consequence of incorrect functioning of the polyadenylation signal as a terminator. In LGI lines, besides the expected *LacZ* and *GFP* transcripts, an additional band of unknown composition appears. In any case, we have never detected cross-hybridization between the different bands, demonstrating that transcription and intron processing were carried out correctly.

Transcript accumulation in these lines was carried out comparing the relative expression of *LacZ* and *GFP* in each one of the LG, LGD, and LGI lines via densitometric analysis of Northern blots (Fig. 6). The introduction of a polyadenylation signal to make both units independent in the LGD lines signif-

TABLE IV

Comparison of β -galactosidase and GFP expression patterns under the control of the PM (4 kb) and mPM (2.7 kb) promoters

+ and - indicate the presence or absence of staining.

		Analyzed					
		lines	TDT	IFM	Abdomen	Larvae	Embryo
PM4i		6	+	—	+	+	+
mPGFP		1	—	+			
LG		3	+	—	+	+	+
			—	+			
LGD		2	+	—	+	+	+
			—	+			
LGI		2	+	—	+	+	+
			—	+			

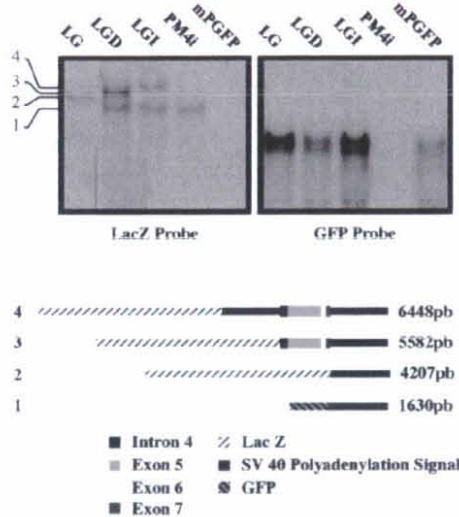


FIG. 6. Northern blot analysis of the transgenic LG, LGD, LGI, PM4i, and mPGFP lines. Total RNAs from late pupae of the LG, LGD, LGI, PM4i, and mPGFP lines were purified, and Northern blot analysis was carried out with LacZ and GFP probes (upper panel). No cross-hybridization between the distinct bands is observed. The lower portion of the figure depicts the composition and size of each detected band. In the LGI lines an additional band of unknown composition appears (4).

in expression is minor. No effect in the larval musculature was observed when all E boxes were mutated (Fig. 4C). It is also clear that no synergism involving MEF2 working through the E boxes is seen in larval muscles (see larvae in Fig. 4, B and C).

In adults, IFM misexpression (regarding PM 4 and PM 1.7 lines) appears in the lines that have either the MEF2 site or the distinct E boxes mutated, indicating that the distinct sites are important for a proper PM expression in the adult muscles. The direct interaction of an MEF regulatory complex with these sites may be needed to give specificity to PM expression in individual muscle types. Moreover, in adults, the reduction of transgene activity is minor in the lines carrying mutations either in the MEF2 site or in the E boxes (MM, E2M, 1/3M, and 3EM) when compared with the lines carrying the MEF2-E region deleted (PM 1.4). These results suggest that other *cis* elements are located in the distal muscle activator enhancer

and are important to maintaining the levels of transgene expression. It is possible that cooperative activation involving the MEF2 site and the E boxes present in the region is important for PM gene activation in adult musculature. If the E boxes located in this region exert a role in regulation of PM expression in adult muscles, NAU or another bHLH factor could be involved. *In vitro* transcribed-translated NAU, the homologue of MyoD in *Drosophila* (26), binds to these E boxes. Another explanation could be that these E boxes do not play the same role as in vertebrate muscle genes.

With respect to the exact role of the MEF2 site and the E boxes in the regulation of the PM expression, our results lead us to hypothesize that the absence of the MEF2 site in larvae transforms the promoter into a weak tissue-specific promoter. Instead, in adults, the direct interaction of an MEF2 regulatory complex with this region may be needed not only to reach high levels of expression but also to give specificity to the PM expression in individual muscle types. Furthermore, the PM misexpression in IFM may be due to an incorrect binding of the whole MEF2 regulatory complex when the MEF2 site or the E boxes are altered. On the other hand, these findings may reveal the presence of other proteins different from MEF2 and bHLH factors participating in the MEF2 regulatory complex (Fig. 7B), mediating a repressive effect in some muscles, as may happen with IFM. Supporting this idea, an MEF2 binding repressor in *Xenopus* has been identified recently (44).

LacZ activity is not completely abolished until the region containing the PDP1 sites is eliminated. A similar effect was seen when the MEF2 site was mutated in the muscle-specific activator region of the *Drosophila* tropomyosin gene, where the activity decreased but was not abolished completely (45). A possible explanation for our finding could be that the region containing the PDP1 sites is responsible for the low basal level temporal- and muscle-specific expression, the MEF2-E region regulates high levels of PM expression in specific muscles, and the MEF-E region acts together with the PDP1-containing region. Our results and those of others (45, 46) suggest that the regulatory mechanism and the major organization of the enhancers and regulatory elements contributing to stage- and tissue-specific expression of *Drosophila* muscle structural genes could be similar.

The absence of an element that enhances PM expression in

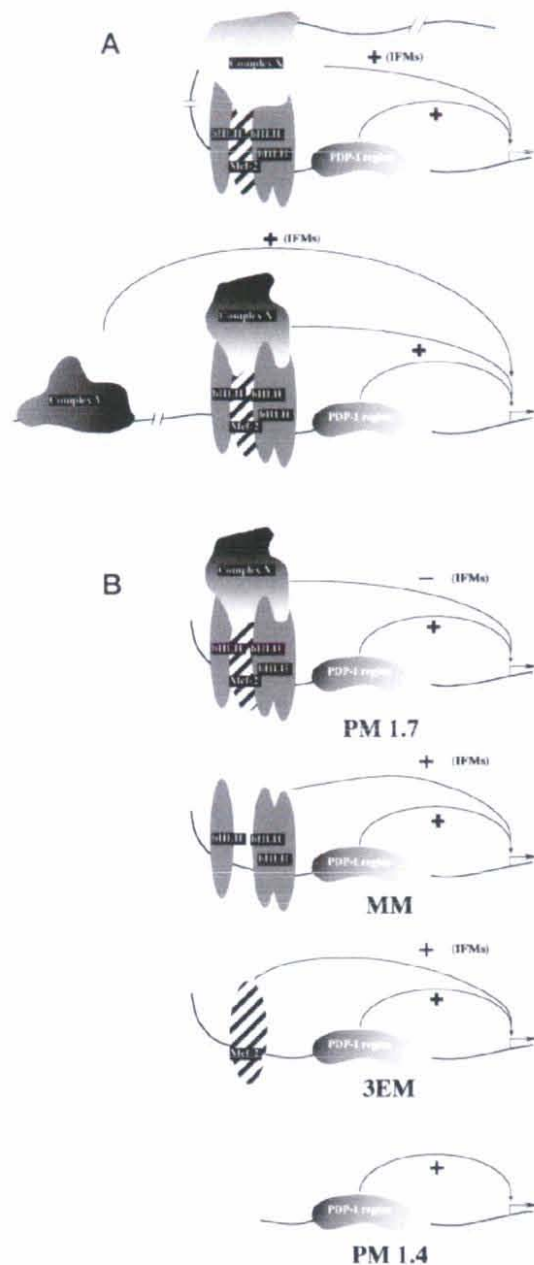


FIG. 7. Possible models for the PM regulation by the MEF-E region. A, two possible models of how the MEF2-E region may participate in the regulation of the PM expression. On top, direct interaction between an MEF2 regulatory complex containing MEF2 and bHLH factors bound to their DNA binding sites and an unknown DNA binding element is required to fully activate transcription in *Drosophila* muscles. Alternatively, this unknown element would independently control PM expression in IFMs. In larvae, only the requirement of the MEF2 site seems to be essential for proper expression. B, the absence of the MEF2 site, the E boxes (MM and 3EM lines), or the whole MEF-E region (PM 1.4 lines) prevents the whole activator complex from being formed. This complex is shown on top (PM1.7 lines).

IFM and the lack of effect of the IFM element in the mPM promoter upon PM expression leave the issue of how PM is expressed in IFM unresolved. In the tropomyosin (37), myosin heavy chain (47), and troponin T² genes in *Drosophila*, the IFM-controlling elements are localized in intron 1. The element

responsible for IFM expression of PM is not located in intron 1 of the PM/mPM gene (data not shown).

In Fig. 7A, we present two models of how the MEF2-E region may participate in the regulation of PM expression. Both models call for the presence elsewhere of an enhancer element that mediates increased levels of PM expression in IFM. The element controlling PM expression in IFM may act either through its interaction with the MEF-E regulatory complex or in an independent manner. Our results do not distinguish between the two possibilities. In the latter case, as suggested above, interaction of a regulatory protein complex with the whole MEF2-E region would be required for proper expression in the other specialized muscles (Fig. 7A). In larvae, only the requirement of the MEF2 site seems to be essential for proper expression.

Interestingly, the intron 7 region that controls mPM expression does not contain MEF2 sites or E boxes. Our *in vivo* studies show that the MEF2 site in the PM promoter is not involved in spatial and temporal control of mPM expression. Our studies clearly reveal that expression of the adult-specific mPM protein is regulated differently from most of the *Drosophila* muscle proteins that are expressed in both embryonic and adult muscles. The absence of an MEF2 site has also been seen in the Act 88F promoter region, which drives protein expression exclusively in IFMs (49). If the MEF2 factor is needed to control the expression of mPM, regulation has to occur indirectly through another transcriptional complex. An important overall conclusion of our work is that the regulation of some *Drosophila* muscle genes may not follow the same rules as in vertebrates.

The Two Transcriptional Units of the PM/mPM Gene Act Independently—The promoters of the gene separately regulate the expression of two transcripts. These transcripts share two exons and are expressed in the same fibers during pupal myogenesis. This type of genomic organization is also present in the *Drosophila* tropomyosin and myosin heavy chain genes (48, 50–52). Internal promoters in these genes produce transcripts encoding cytoplasmic tropomyosin and the myosin rod protein, respectively (48).

The PM/mPM gene is a good model for studying the interaction, if any, of dual promoters. Steric impediments may exist if RNA polymerases transcribe PM and mPM RNAs at the same time during pupal myogenesis. It is unclear how RNA polymerase solves the problem of read-through and whether this solution provides a mechanism for regulating the level of expression of both proteins in adults. We did investigate whether enhancer/s required for PM expression might be located in the mPM regulatory region or *vice versa*. Because the element controlling the expression of PM in IFM is not present in its upstream regulatory region, we investigated whether the IFM-controlling element of mPM also drives PM expression in IFM. Our results showed that each promoter regulates the expression of each transcript independently and that the element controlling the expression of mPM in the IFM is not able to drive the expression of PM in these muscles. Likewise, the PM elements did not enhance mPM expression in the TDT muscles that lacked this transcript in the mP 2.7 lines. Thus, although they are encoded by overlapping units and share two exons, PM and mPM are transcriptionally regulated as if they were in different loci.

A possible explanation of how the two promoters of the gene can function with no influence of one on the other may be that both promoters, in fact, do not function in the same nucleus. Muscle fibers are a syncytium. Recently Newlands *et al.* (38) demonstrated in mice that individual nuclei present in the

² J. A. Mas, P. Benoist, and M. Cervera, unpublished data.

same muscle cell do not transcribe the same genes at the same time. Genes can be transcribed or not in a particular nucleus, but the number of nuclei that transcribe a specific gene is constant. This may occur for the PM/mPM gene. If so, both PM and mPM transcripts would never be transcribed in the same nucleus, and the two transcriptional machineries would work independently. Another possible explanation may be the presence of an insulator separating the two promoters.

Acknowledgments—We thank Dr. R. Storti for the critical reading of the manuscript. We thank M. Calleja and M. San Roman for technical assistance. We are grateful to Dr. H. Nguyen, Dr. R. Storti, Dr. F. Kafatos, and Dr. S. Abmayr for the gift of the plasmids and antibodies MEF2, PDP1, and CF2 and NAU, respectively. We thank A. Fernández and R. Uña for help with the photographs.

REFERENCES

- Bandman, E. (1992) *Dev. Biol.* **154**, 273–283.
- Black, B. L., and Olson, E. N. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 167–196.
- Ludolph, D. C., and Konieczny, S. F. (1995) *FASEB J.* **9**, 1595–1604.
- Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., and Olson, E. N. (1995) *Cell* **83**, 1125–1136.
- Edmondson, D. G., Lyons, G. E., Martin, J. F., and Olson, E. N. (1994) *Development* **120**, 1251–1263.
- Lilly, B., Galewsky, S., Firulli, A. B., Schulz, R., and Olson, E. N. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5662–5666.
- Nguyen, H. T., Bodmer, R., Abmayr, S. M., McDermott, J. C., and Spoerel, N. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7520–7524.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M., and Nguyen, H. T. (1995) *Genes Dev.* **9**, 730–741.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B. M., Schulz, R., and Olson, E. N. (1995) *Science* **267**, 688–693.
- Scott, M. P. (1994) *Cell* **79**, 1121–1124.
- Becker, K. D., O'Donnell, P. T., Heitz, J. M., Vito, M., and Bernstein, S. I. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 669–681.
- Maroto, M., Arredondo, J. J., San Roman, M., Marco, R., and Cervera, M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4375–4382.
- Maroto, M., Arredondo, J. J., Goulding, D., Marco, R., Bullard, B., and Cervera, M. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 81–92.
- Bernstein, S. I., O'Donnell, P. T., and Cripps, R. M. (1993) *Int. Rev. Cytol.* **143**, 63–152.
- Baylies, M. K., Bate, M., and Gomez, M. (1998) *Cell* **93**, 921–927.
- Bate, M. (1990) *Development* **110**, 791–804.
- Taylor, M. V., Beatty, K. E., Hunter, H. K., and Baylies, M. K. (1995) *Mech. Dev.* **50**, 29–40.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., and Perrin-Schmitt, F. (1988) *EMBO J.* **7**, 2175–2183.
- Bate, M., Rushton, E., and Currie, D. A. (1991) *Development* **110**, 79–89.
- Cripps, R. M., Black, B. L., Zhao, B., Lien, C.-L., Schulz, R. A., and Olson, E. N. (1998) *Genes Dev.* **12**, 422–434.
- Currie, D. A., and Bate, M. (1991) *Development* **113**, 91–102.
- Fernandes, J., Bate, M., and Vijayraghavan, K. (1991) *Development* **113**, 67–77.
- Azpiaz, N., and Frasch, M. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1325–1340.
- Bodmer, R. (1993) *Development* **118**, 719–729.
- Borkowski, O. M., Brown, N. H., and Bate, M. (1995) *Development* **121**, 4183–4193.
- Abmayr, S. M., and Keller, C. A. (1998) *Curr. Top. Dev. Biol.* **38**, 35–80.
- Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Bate, M., Arias, A. M., and Maniatis, T. (1990) *Genes Dev.* **4**, 2086–2097.
- Paterson, B., Walldorf, U., Eldridge, J., Dubendorfer, A., Frasch, M., and Gehring, W. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3782–3786.
- Gogos, J. A., Hsu, T., Bolton, J., and Kafatos, F. C. (1992) *Science* **255**, 1951–1955.
- Lin, S. C., Lin, M.-H., Horvath, P., Reddy, K. L., and Storti, R. V. (1997) *Development* **124**, 4685–4796.
- Reddy, K. L., Wohlwill, A., Dzitoeva, S., Lin, M.-H., Holbrook, S., and Storti, R. V. (2000) *Dev. Biol.* **224**, 401–414.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467.
- Thummel, C. S., Boulet, A. M., and Lipshitz, H. D. (1988) *Gene* **71**, 445–456.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 177–183, Academic Press, San Diego, CA.
- Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1982) *Science* **218**, 341–345.
- Ashburner, M. (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Meredith, J., and Storti, R. V. (1993) *Dev. Biol.* **159**, 500–512.
- Newlands, S., Levitt, L. K., Robinson, C. S., Karpf, A. B. C., Hodgson, R. M., Wade, R. P., and Hardeman, E. C. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2748–2758.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 387–395.
- Benoist, P., Mas, J. A., Marco, R., and Cervera, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7538–7546.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokitis, A., Molkentin, J. D., Olson, E. N., and Schulz, R. A. (1995) *Dev. Biol.* **171**, 169–181.
- Lin, M.-H., Bour, B. A., Abmayr, S., and Storti, R. V. (1997) *Dev. Biol.* **182**, 240–255.
- Sparrow, D. B., Miska, E. A., Langley, E., Reynaud-Deonauth, S., Kotecha, S., Towers, N., Spohr, G., Kouzarides, T., and Mohun, T. (1999) *EMBO J.* **18**, 5085–5098.
- Lin, M.-H., Nguyen, H. T., Dybala, C., and Storti, R. V. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4623–4628.
- Lin, S.-H., and Storti, R. V. (1997) *Dev. Genet.* **20**, 297–306.
- Hess, N., Kronert, W. A., and Bernstein, S. I. (1989) in *Cellular and Molecular Biology of Muscle Development* (Kedes, L., and Stockdale, F., eds) pp. 621–631, A. R. Liss, New York.
- Standiford, D. M., Davis, M. B., Miedema, K., Franzini-Armstrong, C., and Emerson, C. P., Jr. (1997) *J. Mol. Biol.* **265**, 40–55.
- Geyer, P. K., and Fyrberg, E. A. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3388–3396.
- Grenke, L., Lord, P. C., Sabacan, L., Lin, S., Wohlwill, A., and Storti, R. V. (1993) *Dev. Biol.* **159**, 513–527.
- Hanke, P. D., and Storti, R. V. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3591–3602.
- Karlik, C. C., and Fyrberg, E. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1965–1973.

Paramyosin and miniparamyosin

Margarita Cervera, Juan Jose Arredondo and Raquel Marco Ferreres*

Departamento de Bioquímica & Instituto de Investigaciones Biomédicas, UAM-CSIC,

Facultad de Medicina, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid. Spain.

Email: margarita.cervera@uam.es

Phone: 34 91 397 5402

Fax: 34 91 585 4401

*Corresponding author [email: margarita.cervera@uam.es; telephone: 34-91-397-5402; fax: 34-91-585-4401]

Table of contents

Overview

- I. Introduction
 - A. Paramyosin and miniparamyosin, components of invertebrate thick filaments
 - B. Paramyosin and miniparamyosin in insect muscles
 - C. Paramyosin, myosin and thick filament structure
 - D. Paramyosin and miniparamyosin function in myofibril formation
- II. Regulation and control
 - A. General organization of the gene
 - B. Temporal and spatial control of the gene
- III. Evolutionary aspects
- IV. Concluding remarks

Overview

In *Drosophila*, paramyosin and miniparamyosin are structural components of thick filaments that have a similar structure to the myosin heavy chain rod tail. Both proteins are rod-like molecules with a high α -helical content in the long central domains, and exist as dimers. While miniparamyosin is mainly located in the M line and at both ends of the thick filaments in *Drosophila* indirect flight muscles (IFM), paramyosin is present all along the thick filaments. The relative amounts of myosin, paramyosin and miniparamyosin vary in the distinct muscles, reflecting the differences in the organization of their thick filaments. Moreover, as for other contractile proteins, the phosphorylation of these two proteins is involved in the acquisition of the capacity to fly. Thus, miniparamyosin has a possible role in the sequential transition of nonfunctional to functional muscle, in general, while the paramyosin transition is more specifically related to the functional onset of IFM.

Paramyosin and miniparamyosin are encoded by the same gene, which contains 10 exons and 9 introns. In *Drosophila*, paramyosin and miniparamyosin share only the last two exons and have a molecular weight of 107 and 60 kDa, respectively. In a similar manner to other *Drosophila* muscle proteins, paramyosin is expressed at two distinct stages of development, while miniparamyosin is present only in the adult musculature. The complex spatio-temporal patterns of paramyosin and miniparamyosin expression depend on two different promoters situated upstream of their transcriptional initiation sites, these two promoters being organized in a modular fashion. In early embryonic development, paramyosin functions as a cytoplasmic protein where it plays an important role in myoblast fusion before its assembly into thick filaments. The properties of thick filaments in invertebrates vary in response to the proportions of myosin, paramyosin and additional proteins such as miniparamyosin, myosin rod protein, and flightin among others.

I. Introduction

A. Paramyosin and miniparamyosin, components of invertebrate thick filaments

Paramyosin and miniparamyosin are two proteins that are only found in association with thick filaments in invertebrate striated muscles. *Drosophila* paramyosin is a major structural component of thick filaments and it is similar in structure to paramyosin from other invertebrates, having a central α -helical coiled-coil rod flanked by two non α -helical terminal regions.¹⁻³ The terminal regions of *Drosophila* paramyosin are very short and these regions are much less conserved than the rod portion when the sequences of different species are compared.

Paramyosin has a very similar structure to the myosin heavy chain rod tail. It contains 878 amino acids and is a rod-like molecule in which two 102 kDa monomers interact to form a coiled coil.^{2, 4} Indeed, it displays the biophysical properties expected of a largely α -helical protein. In *Drosophila melanogaster* three paramyosin isoforms exist, which share a similar molecular mass. In general, the protein accumulates in the adult head, abdomen and thorax and *in vivo*, the appearance of the most acidic phosphorylated isoform of paramyosin has been specifically related to the functioning of the flight-related thoracic musculature.⁵ Moreover, as in the case of myosin light chains, and of the flightin protein, it appears that the phosphorylation of the paramyosin isoforms may modulate the assembly and/or function of thick filaments.⁶⁻⁹

Paramyosin is produced during two different stages of development. It is detected at the late embryonic stages and remains present through the larval instars. It can then be detected again in mid-pupal stages through adulthood. The protein appears at around ten hours post-fertilization and it accumulates progressively during middle and late

embryogenesis, until reaching maximal levels in adults. The protein is present in oocytes and very early embryos (3 hours of development), indicating a possible maternal inheritance. By immunocytochemistry in whole embryos and cryosections of adult flies, paramyosin protein can be seen to accumulate in all muscle groups: pharyngeal, somatic, visceral and specialized thoracic musculature. In electron microscopy images, paramyosin is distributed along the entire A-band of the sarcomere in *Drosophila* IFM and Tergal depressor of the trochanter (TDT) muscles.⁵

The miniparamyosin dimer is a minor component of myofibrillar thick filaments.^{1, 5} This protein is found mainly in the thoracic tubular jump muscles (TDT) while it is much less predominant in the fibrillar flight muscles. The miniparamyosin monomer has a predicted molecular weight of 54.887 daltons and it shares a common 363 amino acid C-terminal α -helical domain with paramyosin. In addition, miniparamyosin has a unique 114 amino acid N-terminal domain that lacks homology to other known proteins.¹ Although miniparamyosin is present in many invertebrates including arthropods, annelids, mollusks, and echinoderms, it is not found in the nematode *Caenorhabditis elegans*, nor in vertebrates.¹⁰ Six *in vivo* phosphorylated miniparamyosin isoforms have been identified in the head and thoracic musculature, over a very wide pH range (pH 6 to 8). As with paramyosin, it is possible that the phosphorylation/dephosphorylation of miniparamyosin is involved in the acquisition of flight ability.⁵

In contrast to paramyosin, miniparamyosin is almost exclusively found in the adult musculature. A transient accumulation of miniparamyosin has been detected in 3^d instars larvae but this decreases rapidly during pupation.⁵ Furthermore, miniparamyosin is differentially distributed in the sarcomeres of *Drosophila* muscle.⁵ In the IFM, the protein is found in the M-line and at the ends of the A-band whereas in the TDT, it is located throughout the A-band.

B. Paramyosin and miniparamyosin in insect muscles

The paramyosin content of invertebrate muscles varies with the structural organization of the fibers and with the dimensions of the thick filaments.^{3, 10-12} Thus, a myosin/paramyosin ratio close to or minor than 1 has been reported for lamellibranch smooth adductors. In these molluscan "catch" muscles, the thick filaments range from 0.05 to 0.15 μm in diameter and from 10 to 40 μm in length. In *Drosophila*, the myosin/paramyosin ratio of fibrillar muscle is 34:1, while for tubular muscle it is 6:1.³ Through a biochemical analysis of different muscle-types in distinct species, a wide range of myosin/paramyosin ratios have been established.^{3, 10-12}

Invertebrate muscles were originally classified into 3 groups with respect to the length of the thick filaments and the maximum active tension.¹² Class I muscles, structurally most similar to vertebrate striated muscles, have short thick filament lengths (1.9 μm) and the lowest paramyosin/myosin ratios (less than 0.2). Class II muscles, intermediate in structural type between Class I and smooth catch muscles (Class III), have higher thick filament lengths (3 μm) and ratios (0.3-0.6) and Class III muscles have the highest ratios (greater than 2.0). When filament length and the myosin/paramyosin ratios are compared in muscles of different species, it appears that paramyosin is involved in determining the length and the active tension generated.¹² This was later confirmed in a study of *C. elegans* mutants.¹³ When correlated to the classification set out previously¹², *Drosophila* fibrillar and tubular muscles can be included in class I, fibrillar muscles having one of the highest myosin/paramyosin ratios and tubular muscles one of the lowest in the group. However, in agreement with the differences in paramyosin content, the thick filaments are shorter in fibrillar than in tubular muscles.

Drosophila muscles can be grouped into four categories based on the relative amount of myosin, paramyosin and miniparamyosin: i) miniparamyosin and paramyosin

are abundant protein components, as seen in adult tubular muscle (TDT), with a paramyosin/miniparamyosin ratio near to 1; ii) paramyosin is expressed at higher levels than miniparamyosin and there is a relatively high ratio of paramyosin to myosin as found in leg and abdomen muscles; iii) there is a low ratio of paramyosin and miniparamyosin to myosin, as in *asynchronous indirect flight muscles*; iv) there is no miniparamyosin and relatively large amounts of paramyosin as in embryonic supercontractile muscles.⁵ Furthermore, the relatively large number of paramyosin and miniparamyosin isoforms adds to the diversity of thick filaments in adult invertebrate muscles.

C. Paramyosin, myosin and thick filament structure

Paramyosin and myosin are the most abundant proteins in invertebrate thick filaments, and it has been proposed that the alpha-helical coiled-coil paramyosin dimer interacts with its homologous counterpart, the myosin rod dimer.¹⁴⁻¹⁸ Analysis of the paramyosin and myosin heavy chain rod sequences has revealed a remarkable pattern of alternating groups of charged residues associated with a 28 residue repeat.¹⁹ Interactions between these oppositely charged segments are thought to play a significant role in the assembly of these two proteins into thick filaments.^{20, 21} The C-terminal domains of both molecules are critical for both solubility and assembly. These domains appear to function as modulators of assembly in both proteins.¹⁹ Although previous studies demonstrated that myosin and paramyosin possessed the ability to self-assemble,^{3, 22} the filaments formed *in vitro* lacked important features of thick filaments *in vivo*. Nevertheless, the organization and exact location of paramyosin in the structure of the insect thick filaments remains unclear. It is proposed that paramyosin, together with additional proteins, is assembled in the core of the thick filament. This disposition will facilitate the attachment of myosin, the functional motor protein of the thick filament, at the periphery of the filament.

Accumulated evidence suggests that in invertebrates, the assembly of thick filaments of distinct length, diameter, electron density and rigidity requires the presence of myosin, paramyosin and several additional proteins, such as miniparamyosin, myosin rod protein and flightin, among others.^{1, 5, 23-26} These proteins are present in distinct amounts according to the length, diameter and electron density of the fibres.^{3, 5} Thus, in various invertebrates a correlation has been established between the properties of the muscles and the amount of paramyosin.^{3, 5, 27, 28} In *C. elegans* paramyosin mutants, the length and diameter of thick filaments are also affected by the paramyosin content.¹³ A model of thick filament structure has been proposed wherein the tubular thick filament core in *C. elegans* is formed by seven paramyosin subfilaments supported by an internal sleeve of filagenins, each paramyosin subfilament containing four strands of paramyosin.^{29, 30} Since filagenins have not been identified in *Drosophila* and many more distinct types of fibres are present in insects, different mechanisms of molecular assembly may exist in different organisms.

D. Paramyosin and miniparamyosin function in myofibril formation

The differences in the functional role of paramyosin and miniparamyosin in each type of insect muscle probably reflect the characteristics and specialized requirements of each muscle.

Paramyosin functions as a cytoplasmic protein in early embryonic development and is important for myoblast fusion and myofibril formation.³¹ Homozygous paramyosin mutants, *prm1*, obtained by mobilizing a P element located in the paramyosin promoter, are strongly hypomorphic alleles of the paramyosin gene (paramyosin is reduced to 1% of wild type level). They die at the late embryo stage and display defects in both myoblast fusion and myofibril assembly in muscles of the embryonic body wall (Figure 1). Sarcomeres do not assemble properly and muscle contractility is impaired. Paramyosin was shown to be important for the production of an adequate number of morphologically normal thick

filaments. Although thin filaments are correctly assembled in these mutants, thick filament containing paramyosin are important for the organization of the regular sarcomeric patterns (Figure 1). An abnormal interaction between thin and thick filaments might be the cause of this phenotype. As in these paramyosin mutants, most of the *null* mutations affecting *Drosophila* contractile proteins disrupt sarcomere organization, highlighting the influence that the interaction between thin and thick filaments has on the sarcomere.³²⁻³⁷

The role of miniparamyosin in muscle assembly, development, and function has been assessed by analyzing the phenotypic perturbations produced by protein overexpression in *Drosophila*.³⁸ Such analyses were focused on the IFM, since IFM myofibril assembly and flight ability are quite sensitive to the stoichiometry of muscle proteins.³⁹ In contrast to expectations, overexpression of miniparamyosin has little impact on the assembly of IFM myofibrils, neither thick filament electron density nor sarcomere length is affected. Nevertheless, overexpression of miniparamyosin does cause IFM dysfunction and age-dependent myofibril degeneration. Transgenic flies undergo progressive deterioration of the myofibrils, producing a gradual loss of flight muscle functionality. These observations indicate that the correct stoichiometry of miniparamyosin is important to maintain integrity of myofibrils, and for the proper function of the flight musculature.

II. Regulation and control

The differentiation of muscle types is a complex, multistep developmental process involving multiple gene regulatory mechanisms.⁴⁰⁻⁴² This process is largely controlled by the transcriptional regulation of a large battery of genes encoding muscle-specific proteins.⁴³ The differences in the contractile and biochemical properties of muscle types originate in the selective expression of genes encoding specific contractile protein isoforms. The mechanisms controlling the expression of each of these genes are highly

tissue specific, and they are rapidly and strongly activated only in muscle lineages. However, protein accumulation varies in each type of muscle according to their specific properties and functions.³⁹

The proteins stoichiometry during myofibril assembly must be maintained and as such, the activation or down-regulation of a muscle protein-encoding gene must be precisely offset by the regulation of other genes. Previous studies have suggested that the molecular pathways controlling muscle formation are ancient and evolutionary conserved in flies and vertebrates⁴⁴. In *Drosophila*, in contrast to mammals, few specialized muscle types are generated and each muscle-type is composed of only one fiber type.^{45, 46} In this sense, the paramyosin/miniparamyosin gene in *Drosophila melanogaster* represents a good model system to study the regulatory mechanisms controlling expression of muscle specific genes.

A. General organization of the gene

The structure of the *Drosophila melanogaster* paramyosin/miniparamyosin gene has been determined by DNA sequencing of cDNA and genomic clones.^{1, 2} The paramyosin/miniparamyosin gene is located in region 66D14 on the left arm of the third chromosome, and it spans 12.8 kb, organized into 10 exons and 9 introns (figure 2). Through the use of different promoters and alternative exon splicing, this gene encodes both paramyosin and miniparamyosin, which share the last two exons of the gene (exons 8 and 9). Paramyosin uses an upstream promoter and is encoded by the 9 exons of the gene, all except exon 1B, which is located in an intron that follows exon 7 and encodes the 5' end of miniparamyosin. Indeed, miniparamyosin is produced by the use of an alternative promoter, and it includes exon 1B joined to the last two exons of the paramyosin transcript by RNA splicing. The two overlapping transcriptional units of the

paramyosin/miniparamyosin gene act independently, thus, the two promoters of the gene separately regulate the expression of the transcripts. Indeed, during pupal myogenesis, both transcripts are expressed in the same fibers. This type of genomic organization has also been described for the *Drosophila* tropomyosin and myosin heavy genes. Internal promoters in these genes produce transcripts encoding cytoplasmic tropomyosin and the myosin rod protein, respectively.^{26, 47-50}

B. Temporal and spatial control of the gene

The paramyosin/miniparamyosin genes from *D. melanogaster*, *D. virilis* and *D. pseudoobscura* share a high degree of similarity in their open reading frames. Despite the fact that *D. pseudoobscura* and *D. virilis* diverged from *D. melanogaster* more than 30 and 50 millions years ago, the two genes display identical patterns of expression in each of the three species. The complex spatio-temporal regulation of paramyosin and miniparamyosin expression depends on two regulatory regions situated upstream of the transcriptional initiation sites of the paramyosin and miniparamyosin mRNAs, each with distinct properties. Through a transgenic approach complemented with sequence comparison, we have established that these two promoters present a modular organization, supporting and providing a theoretical foundation for our experimental findings *in vivo*.⁵¹

Both promoters contain regions extending 90-100 nucleotides upstream of the paramyosin and miniparamyosin transcriptional initiation sites. These regions are over 90% conserved in the three *Drosophilidae*, indicating that they may correspond to RNA polymerase complex binding domains. Moreover, apart from paramyosin expression in IFM, the spatial and temporal patterns of transgene expression driven by both promoters depend on discrete regions located between -0.9 and -2 kb of the paramyosin and miniparamyosin initiation sites. Thus, besides the basal promoter, two discrete regions in the paramyosin promoter have been identified.⁵¹ A MEF2-E region,⁵² containing a group of

conserved E boxes and a MEF2 site, is located -1400bp upstream of the start site and seems to act as a distal muscle activator that differently regulates paramyosin expression in embryonic/larval and adult muscles (figures 2 and 3). This region is essential for the high levels of expression in larval muscles. A second region, containing several PDP1 and CF2 sites,^{24, 53} seems to be responsible for the low basal levels, and the temporal- and muscle-specific expression. Indeed, the expression of the transgene is not completely abolished until the region containing the PDP1 sites is eliminated. These MEF-E and PDP1/CF2 regions act co-coordinately to reproduce the complete spatio-temporal pattern of paramyosin expression.

Miniparamyosin expression is regulated by the basal promoter and three highly conserved elements, which have been named AB (127bp), BF2 (34bp), and TX (263bp). These are located at -477 to -740 (TX element), -1173 to -1207 (BF2 element) and -1342 to -1469 (AB element). The AB element specifically drives high levels of expression in IFM, whereas the TX element drives high levels of expression in TDT and low expression in larval body wall muscles. The presence of the two elements, AB and TX, is needed to recapitulate transgene expression in adult hypodermic muscles. The BF2 element is unable to direct detectable reporter expression by itself. However, when transgene transcription is directed by a combination of BF2 with either, TX or AB, transgene expression decreases in IFM and TDT. BF2 might acts as an expression modulator in adult muscles.

An interesting aspect of paramyosin/miniparamyosin expression is how the overlapping transcriptional units regulate transcription of the two mRNAs during adult myogenesis. Despite the fact that the two proteins are expressed at the same stage of adult development, the transcriptional units act independently.⁵¹ One possible explanation for how these two promoters can function without influencing one another may be that the promoters don't act in the same nucleus. Muscle fibers are a syncytium, and in the mouse it

has been demonstrated that individual nuclei present in the same muscle cell do not necessarily transcribe the same genes at the same time.⁵⁴ Indeed, genes may or may not be transcribed in a particular nucleus, but the number of nuclei that transcribe a specific gene is constant. This might occur in the case of the paramyosin/miniparamyosin gene. A further possible explanation invokes the presence of an insulator that defines independent domains of gene function throughout the genome separating the two promoters.

III. Evolutionary aspects

The evolutionary diversification of paramyosin in invertebrates, including the presence of miniparamyosin, has been investigated by using antibodies specific to the two proteins.¹⁰ Both types of proteins have been found in all the invertebrate species studied except *C. elegans*. Paramyosin shows slight variations in its molecular mass but these are minor compared to the wide variation in molecular mass of miniparamyosin (from 50 to 80 kDa). A specific antiserum against *Drosophila* miniparamyosin recognizes a single protein with a similar mobility to miniparamyosin only in *Diptera*. In contrast, the antiserum recognizes two proteins, paramyosin and the putative miniparamyosin, in all the other species analyzed, including *Sphaerechinus*, *Mytilus*, *Helix*, *Scalopendra*, *Locusta*, *Formica* and *Coccinella*. This suggests that the protein domain specific to *D. melanogaster* miniparamyosin (exon 1B) may also be expressed in paramyosin in other species. In the *Annelida* and *Mollusca*, this cross-reaction with paramyosin was stronger with the anti-miniparamyosin serum than with a paramyosin specific antisera (exon 5), suggesting that the function fulfilled by the protein domain encoded by exon 1B is common to both proteins in some species. This is in agreement with the much greater variability in exon organization of the paramyosin/miniparamyosin genes in different species⁵. In light of this, it is interesting that the anti-exon 5 antiserum specific to paramyosin, not only recognizes

paramyosin, but also myosin in several invertebrate species. *Coccinella* provides an extreme example because this serum only cross-reacts with myosin, suggesting that a similar exchange of functions may occur, in part, between myosin and paramyosin in these species. Furthermore, in the case of the deuterostome invertebrates, such as *Echinodermus*, the data suggest that a miniparamyosin isoform may be present in addition to the paramyosin described. In conclusion, we suggest that the patterns of antibody reactivity reflect the distinct specialization of the paramyosin gene complex such that, in *Diptera* (possibly through the evolution of a separate regulatory control) miniparamyosin has acquired a structure and function distinct to that of paramyosin. In any case, the widespread occurrence of miniparamyosin in invertebrate muscles and the complexity of the transcriptional regulation of the two distinct proteins encoded by a single gene in *Drosophila* species point to the importance of the functional role of paramyosin and miniparamyosin in producing the structural and functional diversity of invertebrate muscles.

IV. Concluding remarks

Elucidating the detailed organization and the function of the proteins found in distinct invertebrate thick filaments has proved to be a complex task, even for the same functional type of muscles. For example, multiple levels of complexity have been described in the flight muscles thick filaments of different organisms. Indeed, filament length and diameter show wide variations when compared with the relative uniformity found in vertebrate thick filaments. Despite the fact that several models have been proposed, they fail to fully explain the complex situation in invertebrate muscles. Nevertheless, genetic and biochemical studies have begun to reveal a clearer picture of how thick filaments are organized in distinct muscle types. One fact that emerges is the importance of the accessory proteins in these filaments and the influence that the relative amount of such proteins has

on establishing the normal length, diameter and density of the filament. Furthermore, the relative large number of isoforms and the phosphorylation of some of these isoforms can play a vital role in the development and function of muscle. We expect that even greater insight into muscle function will come from studies of the different components of thick filaments.

Figure Legends

Figure 1. Electron microscopy of wild-type and homozygous *prm1* embryonic body wall muscles. Thin and thick filaments in embryonic body wall muscles are well organized. In longitudinal sections (A and B), thin and thick filaments are parallel and arrange into smooth filament bundles. Z-bodies align to form Z-band (A and B, arrows), which mark the myofibrils into sarcomeres. In a cross section (D), each thick filament is composed of several dense particles and they are arranged into a circular entity (arrowheads). Thin and thick filaments are organized into regular arrays. Mutation of paramyosin in *prm1* causes a reduction in thick filament number and disrupts myofibril organization (C and E). *prm1* myofibrils are shorter and wavy (C). Z-band material is poorly organized (C, arrows). In areas where thick filaments are formed, they are structurally abnormal. Dense particles in a cross-section of thick filaments are no longer organized into circular, hollow structures (E, arrowheads). Bars: (A-C) 1 μm ; (D and E) 0.1 μm . Reproduced from **The Journal of Cell Biology**, 2003, 160, 904 by copyright permission of **The Rockefeller University Press**.

Figure 2. Conserved regions in the sequences upstream of paramyosin/miniparamyosin gene in *D. melanogaster* and *D. virilis*. A schematic representation of the *D. melanogaster* paramyosin/miniparamyosin gene. The exons are shown as blue boxes and are specified by number. The lower part shows the alignment of the sequences upstream of the start sites of the paramyosin and miniparamyosin transcription units in *D. melanogaster* and *D. virilis* genes. Proximal regions of both transcriptional units are conserved.¹⁰ The site for MEF2 at -1488 and three E boxes at -1587, -1461 and -1436 in the paramyosin promoter are conserved in *D. virilis*. In the same region, two CF2 sites and

two PDP1 sites are present in *D. melanogaster* but not in *D. virilis*. In the upstream sequences of the miniparamyosin transcription unit, three regions are conserved in sequence and position. These are located at -477 to -740 (TX element), -1173 to -1207 (BF2 element) and -1342 to -1469 (AB element).

Figure 3. Comparison of β -galactosidase gene expression driven by selected sequences upstream from the paramyosin and miniparamyosin transcription start sites. A, Transgene expression in abdomen and thin thorax sections and dissected 3rd instar larvae transformed with constructs containing the 5' sequences 2.2 Kb upstream of (in the lower part of the MEF2-E region) and 1.4 Kb upstream of (in the lower part of the PDP1-CF2 region) the paramyosin transcription start site, inserted in the pCasper β -gal plasmid. B, Transgene expression in abdomen and thin thorax sections and dissected 3rd instar larvae transformed with a construct containing the 5' sequences 2.7 Kb upstream of the miniparamyosin transcription start site inserted in the pCasper β -gal plasmid. Hypodermic muscles, black arrowhead; IFM, black asterisk; and TDT, black arrow.

References

1. Becker KD, O'Donnell PT, Heitz JM, et al. Analysis of *Drosophila* paramyosin: identification of a novel isoform which is restricted to a subset of adult muscles. *J Cell Biol.* Feb 1992;116(3):669-681.
2. Vinos J, Maroto M, Garesse R, et al. *Drosophila melanogaster* paramyosin: developmental pattern, mapping and properties deduced from its complete coding sequence. *Mol Gen Genet.* Feb 1992;231(3):385-394.
3. Vinos J, Domingo A, Marco R, et al. Identification and characterization of *Drosophila melanogaster* paramyosin. *J Mol Biol.* Aug 5 1991;220(3):687-700.
4. Cohen C, Lanar DE, Parry DA. Amino acid sequence and structural repeats in schistosome paramyosin match those of myosin. *Biosci Rep.* Jan 1987;7(1):11-16.
5. Maroto M, Arredondo J, Goulding D, et al. *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in quantity,

- localization, and isoform pattern: a possible role in muscle maturation and function. *J Cell Biol.* Jul 1996;134(1):81-92.
6. Vigoreaux JO. Alterations in flightin phosphorylation in *Drosophila* flight muscles are associated with myofibrillar defects engendered by actin and myosin heavy-chain mutant alleles. *Biochem Genet.* Aug 1994;32(7-8):301-314.
7. Sparrow J. Flight and phosphorylation. 1995; *Nature*(373):592-593.
8. Tohtong R, Yamashita H, Graham M, et al. Impairment of muscle function caused by mutations of phosphorylation sites in myosin regulatory light chain. *Nature.* Apr 13 1995;374(6523):650-653.
9. Bárány M, Bárány K. Phosphorylation of the myofibrillar proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 1980;42:275-292.
10. Maroto M, Arredondo JJ, San Roman M, et al. Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct paramyosin isoform, widely distributed in invertebrates. *J Biol Chem.* Mar 3 1995;270(9):4375-4382.
11. Beinbrech G, Meller U, Sasse W. Paramyosin content and thick filament structure in insect muscle. *Cell Tissue Res.* 1985;241:607-614.
12. Levine RJ, Elfvin M, Dewey MM, et al. Paramyosin in invertebrate muscles. II. Content in relation to structure and function. *J Cell Biol.* Oct 1976;71(1):273-279.
13. Mackenzie JM, Jr., Epstein HF. Paramyosin is necessary for determination of nematode thick filament length in vivo. *Cell.* Dec 1980;22(3):747-755.
14. Bennett PM, Elliott A. "Splicing" of paramyosin filaments. *J Mol Biol.* May 5 1984;175(1):103-109.
15. Epstein HF, Aronow BJ, Harris HE. Myosin-paramyosin cofilaments: enzymatic interactions with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1976;73(9):3015-3019.
16. Harris HE, Epstein HF. Myosin and paramyosin of *Caenorhabditis elegans*: biochemical and structural properties of wild-type and mutant proteins. *Cell.* Apr 1977;10(4):709-719.
17. Hoppe PE, Waterston RH. Hydrophobicity variations along the surface of the coiled-coil rod may mediate striated muscle myosin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* Oct 1996;135(2):371-382.
18. Szent-Gyorgyi AG, Cohen C, Kendrick-Jones J. Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles. II. Native filaments: isolation and characterization. *J Mol Biol.* Mar 14 1971;56(2):239-258.
19. Cohen C, Parry DA. A conserved C-terminal assembly region in paramyosin and myosin rods. *J Struct Biol.* 1998;122(1-2):180-187.
20. McLachlan AD, Karn J. Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature.* Sep 16 1982;299(5880):226-231.
21. Kagawa H, Gengyo K, McLachlan AD, et al. Paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*. Molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *J Mol Biol.* May 20 1989;207(2):311-333.
22. Huxley HT. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* 1963;7:281-308.
23. Barral JM, Epstein HF. Protein machines and self assembly in muscle organization. *Bioessays.* Oct 1999;21(10):813-823.
24. Reddy KL, Wohlwill A, Dzitoeva S, et al. The *Drosophila* PAR domain protein 1 (Pdp1) gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins

- through the use of multiple enhancers and promoters. *Dev Biol.* Aug 15 2000;224(2):401-414.
25. Vigoreaux JO, Saide JD, Valgeirsdottir K, et al. Flightin, a novel myofibrillar protein of *Drosophila* stretch-activated muscles. *J Cell Biol.* May 1993;121(3):587-598.
 26. Standiford DM, Davis MB, Miedema K, et al. Myosin rod protein: a novel thick filament component of *Drosophila* muscle. *J Mol Biol.* Jan 10 1997;265(1):40-55.
 27. Bullard B, Luke B, Winkelman L. The paramyosin of insect flight muscle. *J Mol Biol.* Apr 5 1973;75(2):359-367.
 28. Bullard B, Dabrowska R, Winkelman L. The contractile and regulatory proteins of insect flight muscle. *Biochem J.* Oct 1973;135(2):277-286.
 29. Epstein HF, Lu GY, Deitiker PR, et al. Preliminary three-dimensional model for nematode thick filament core. *J Struct Biol.* Sep-Oct 1995;115(2):163-174.
 30. Muller SA, Haner M, Ortiz I, et al. STEM Analysis of *Caenorhabditis elegans* muscle thick filaments: evidence for microdifferentiated substructures. *J Mol Biol.* Feb 2 2001;305(5):1035-1044.
 31. Liu H, Mardahl-Dumesnil M, Sweeney ST, et al. *Drosophila* paramyosin is important for myoblast fusion and essential for myofibril formation. *J Cell Biol.* Mar 17 2003;160(6):899-908.
 32. Roulier EM, Fyrberg C, Fyrberg E. Perturbations of *Drosophila* alpha-actinin cause muscle paralysis, weakness, and atrophy but do not confer obvious nonmuscle phenotypes. *J Cell Biol.* Feb 1992;116(4):911-922.
 33. Sparrow J, Drummond D, Peckham M, et al. Protein engineering and the study of muscle contraction in *Drosophila* flight muscles. *J Cell Sci Suppl.* 1991;14:73-78.
 34. Beall CJ, Fyrberg E. Muscle abnormalities in *Drosophila melanogaster* heldup mutants are caused by missing or aberrant troponin-I isoforms. *J Cell Biol.* Sep 1991;114(5):941-951.
 35. Beall CJ, Sepanski MA, Fyrberg EA. Genetic dissection of *Drosophila* myofibril formation: effects of actin and myosin heavy chain null alleles. *Genes Dev.* Feb 1989;3(2):131-140.
 36. Fyrberg E, Fyrberg CC, Beall C, et al. *Drosophila melanogaster* troponin-T mutations engender three distinct syndromes of myofibrillar abnormalities. *J Mol Biol.* Dec 5 1990;216(3):657-675.
 37. O'Donnell PT, Bernstein SI. Molecular and ultrastructural defects in a *Drosophila* myosin heavy chain mutant: differential effects on muscle function produced by similar thick filament abnormalities. *J Cell Biol.* Dec 1988;107(6 Pt 2):2601-2612.
 38. Arredondo JJ, Mardahl-Dumesnil M, Cripps RM, et al. Overexpression of miniparamyosin causes muscle dysfunction and age-dependant myofibril degeneration in the indirect flight muscles of *Drosophila melanogaster*. *J Muscle Res Cell Motil.* 2001;22(3):287-299.
 39. Bernstein SI, O'Donnell PT, Cripps RM. Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*. *Int Rev Cytol.* 1993;143:63-152.
 40. Hughes SM, Salinas PC. Control of muscle fibre and motoneuron diversification. *Curr Opin Neurobiol.* Feb 1999;9(1):54-64.
 41. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol.* Dec 2002;14(6):763-772.

42. Stockdale FE. Mechanisms of formation of muscle fiber types. *Cell Struct Funct.* Feb 1997;22(1):37-43.
43. Buckingham M, Houzelstein D, Lyons G, et al. Expression of muscle genes in the mouse embryo. *Symp Soc Exp Biol.* 1992;46:203-217.
44. Scott MP. Intimations of a creature. *Cell.* Dec 30 1994;79(7):1121-1124.
45. Bate M. The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development.* Nov 1990;110(3):791-804.
46. Baylies MK, Bate M, Ruiz Gomez M. Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell.* Jun 12 1998;93(6):921-927.
47. Karlik CC, Fyrberg EA. Two *Drosophila melanogaster* tropomyosin genes: structural and functional aspects. *Mol Cell Biol.* Jun 1986;6(6):1965-1973.
48. Hanke PD, Storti RV. The *Drosophila melanogaster* tropomyosin II gene produces multiple proteins by use of alternative tissue-specific promoters and alternative splicing. *Mol Cell Biol.* Sep 1988;8(9):3591-3602.
49. Gremke L, Lord PC, Sabacan L, et al. Coordinate regulation of *Drosophila* tropomyosin gene expression is controlled by multiple muscle-type-specific positive and negative enhancer elements. *Dev Biol.* Oct 1993;159(2):513-527.
50. Polyak E, Standiford DM, Yakopson V, et al. Contribution of Myosin rod protein to the structural organization of adult and embryonic muscles in *Drosophila*. *J Mol Biol.* Aug 29 2003;331(5):1077-1091.
51. Arredondo JJ, Ferreres RM, Maroto M, et al. Control of *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene expression. Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription. *J Biol Chem.* Mar 16 2001;276(11):8278-8287.
52. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:167-196.
53. Gogos JA, Hsu T, Bolton J, et al. Sequence discrimination by alternatively spliced isoforms of a DNA binding zinc finger domain. *Science.* Sep 25 1992;257(5078):1951-1955.
54. Newlands S, Levitt LK, Robinson CS, et al. Transcription occurs in pulses in muscle fibers. *Genes Dev.* Sep 1 1998;12(17):2748-2758.

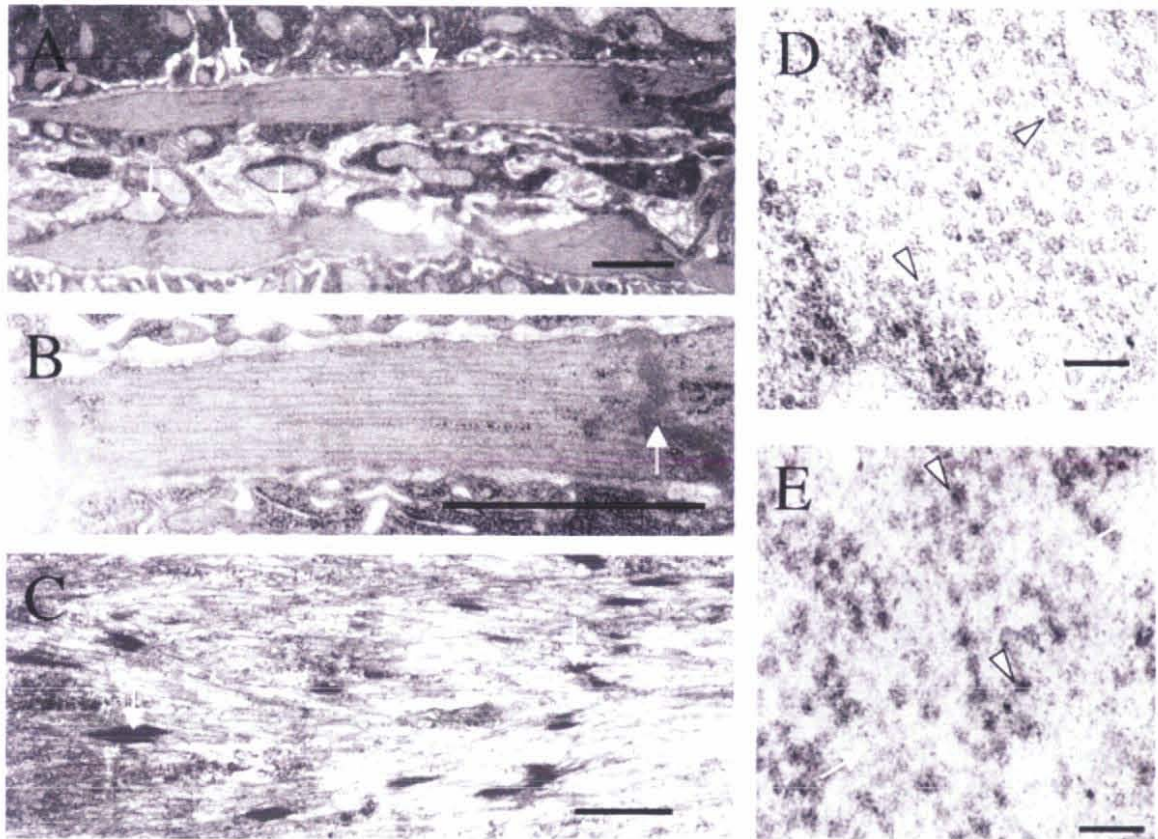
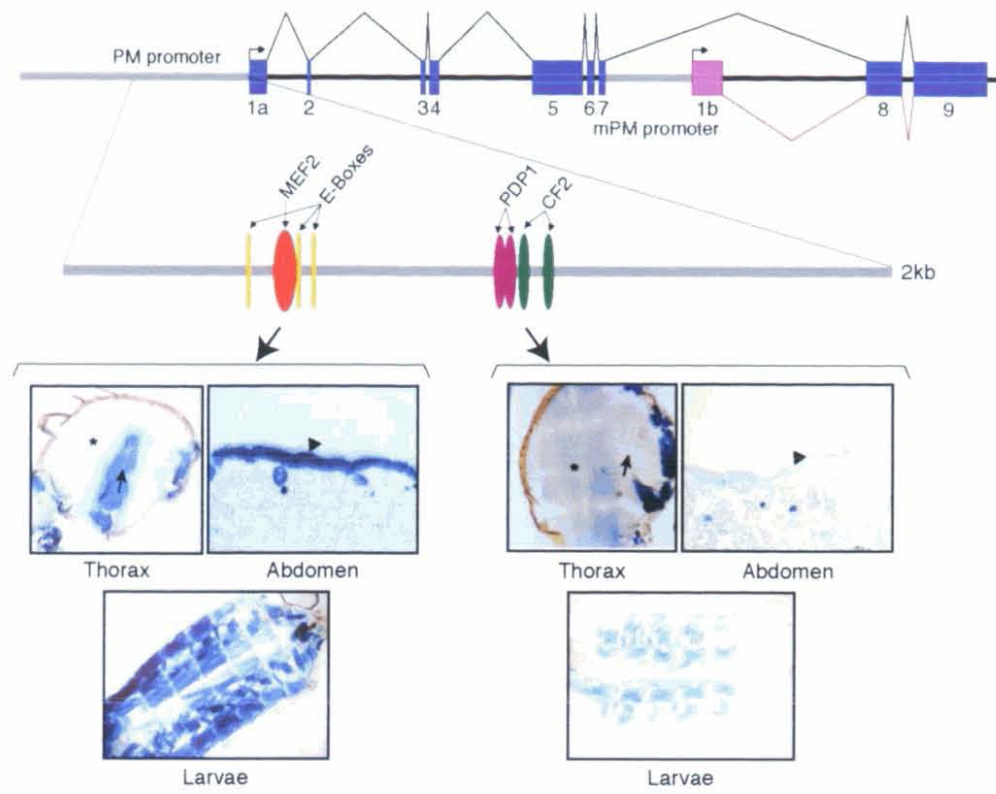


Figure 1

A



B

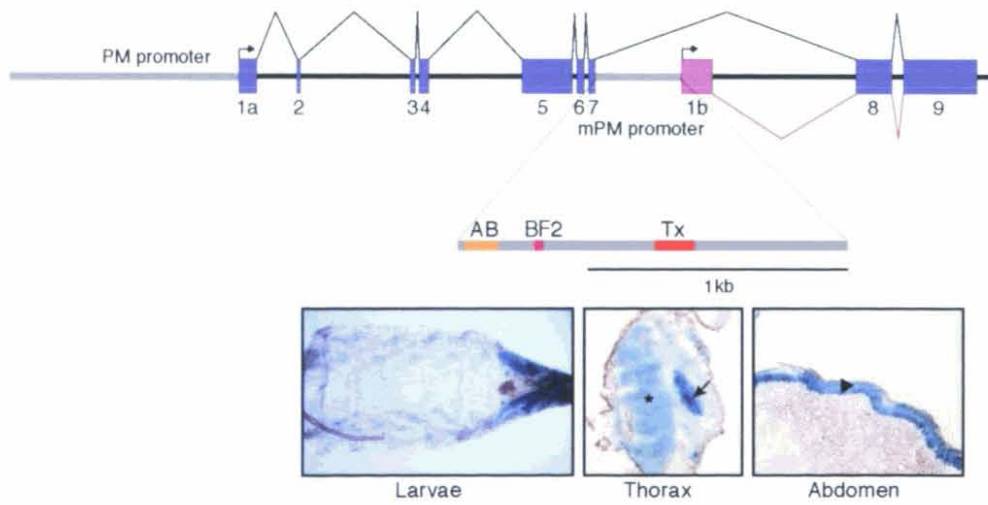


Figure 3